



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**



**DOTTORATO IN SCIENZE VETERINARIE
XXIX CICLO**

TESI

**“Studio longitudinale sulle Dimetilarginine (SDMA e
ADMA) nella diagnosi precoce di insufficienza
renale cronica in cani affetti da malattia mitralica
cronica”**

Candidato

Dr.ssa Silvia Fabbri

Tutor

Prof. Gaetano Oliva

*DOTTORATO IN SCIENZE VETERINARIE - Segreteria Dott.ssa Maria Teresa Cagiano
Coordinamento - Prof. Giuseppe Cringoli*

Alla mia famiglia.

Lista delle abbreviazioni	13
Lista delle figure	17
Lista delle tabelle	19
Abstract	21
Introduzione	27
Bibliografia	30
Capitolo 1. Malattia cronica mitralica nel cane	
1.1 Anatomia e fisiologia dell'apparato mitralico nel cane	35
1.2 Definizione ed eziologia della malattia cronica mitralica	37
1.3 Fisiopatologia	39
1.4 Epidemiologia, classificazione e prognosi della CVD	45
1.5 Diagnosi e sintomatologia della CVD	48
1.5.1 Esame clinico	48
1.5.2 Rilievi elettrocardiografici	48
1.5.3 Ecocardiografia	49
1.6 Terapia	52
1.6.1 Cane asintomatico (Classe B1 e B2 ACVIM)	52
1.6.2 Cane sintomatico (Classe C e D ACVIM)	54
1.7 Complicanze	56
1.7.1 Aritmie	56
1.7.2 Rottura delle corde tendinee (Chordae Tendineae Rupture)	57
1.7.3 Ipertensione polmonare	58
1.7.4 Rottura dell'atrio sinistro	60
1.8 Bibliografia	62
Capitolo 2. Malattia renale cronica nel cane	
2.1 Definizione ed epidemiologia	69
2.2 Eziopatogenesi	70
2.3 Diagnosi di CKD	72
2.4 Manifestazioni cliniche della CKD	73
2.4.1 Poliuria e Polidipsia	73
2.4.2 Sindrome uremica	73
2.5 Rilievi ematobiochimici della CKD	74

2.6	Rilievi radiografici, ecografici ed anatomopatologici	75
2.7	Stadiazione IRIS	78
2.8	Prognosi	82
2.9	Cenni di Terapia in corso di insufficienza renale cronica	83
2.9.1	Trattamento dietetico	83
2.9.2	Correzione dell'iperfosfatemia	84
2.9.3	Fluidoterapia	84
2.9.4	Trattamento dell'ipertensione arteriosa	85
2.9.5	Trattamento dell'anemia	86
2.9.6	Rimodulazione delle terapie in corso di concomitante CKD	87
2.10	Bibliografia	88
 Capitolo 3. Biomarker di CKD		
3.1	Biomarker tradizionali di CKD	93
3.2	Biomarker innovativi di CKD: le Dimetilarginine (SDMA e ADMA)	94
3.2.1	L-arginina e la sintesi delle metilarginine	94
3.2.2	Dimetilarginina simmetrica (SDMA): sintesi e metabolismo	96
3.2.3	Dimetilarginina asimmetrica (ADMA): sintesi e metabolismo	101
3.2.4	Ruolo dell'ADMA nelle malattie cardiovascolari e nell'insufficienza renale	103
3.3	Metodiche di rilevamento della SDMA e dell'ADMA	104
3.4	Intervalli di riferimento e specificità della SDMA e dell'ADMA nei piccoli animali	104
3.5	SDMA e stadiazione IRIS	106
3.6	Bibliografia	109
 Capitolo 4. Sindrome Cardio-Renale nell'uomo		
4.1	Sindrome Cardio-Renale nell'uomo	117
4.2	Definizione ed eziologia delle Sindromi cardio-renali	118
4.2.1	Sindrome Cardio-Renale tipo 1	118
4.2.2	Sindrome Cardio-Renale tipo 2	119
4.2.3	Sindrome Cardio-Renale tipo 3	122
4.2.4	Sindrome Cardio-Renale tipo 4	124
4.2.5	Sindrome Cardio-Renale tipo 5	125

4.3	Diagnosi della Sindrome Cardio-Renale nell'uomo	127
4.4	Principali Biomarker di SCR nell'uomo	127
4.4.1	Brain Natriuretic Peptide	127
4.4.2	Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)	128
4.4.3	Cistatina C (Cys C)	128
4.4.4	Altri biomarker di SCR nell'uomo	129
4.5	Bibliografia	130
Capitolo 5. Sindrome Cardio-Renale nei piccoli animali		
5.1	Sindrome Cardio-Renale nei piccoli animali	137
5.2	Definizione e fisiopatologia dei Cardiovascular-Renal Disorders nel cane	139
5.2.1	Cardiovascular – Renal Disorders _(heart)	139
5.2.2	Cardiovascular – Renal Disorders _(kidney)	141
5.2.3	Cardiovascular – Renal Disorders _(other)	142
5.3	Diagnosi e Stadiazione clinica dei CvRD	143
5.3.1	Classificazione dei pazienti nefropatici e cardiopatici	143
5.3.2	Biomarker di CvRD: i test tradizionali e le nuove scoperte	143
5.3.3	Imaging nei CvRD	145
5.3.4	Misurazione della pressione arteriosa	146
5.4	Management dei CvRD	147
5.4.1	CvRD _h	147
5.4.2	CvRD _k	148
5.5	Bibliografia	151
Capitolo 6. Materiali e metodi		
6.1	Animali arruolati e disegno sperimentale	157
6.2	Esame clinico	158
6.3	Indagini strumentali	158
6.3.1	Misurazione pressione arteriosa	158
6.3.2	Esame elettrocardiografico	158
6.3.3	Esame ecocardiografico	159
6.3.4	Esame ecografico dell'apparato urinario	160
6.4	Indagini di laboratorio	161
6.4.1	Analisi ematobiochimiche	161
6.4.2	Determinazione delle dimetilarginine SDMA e ADMA	161
6.4.3	Esame delle urine	162
6.5	Classificazione ACVIM	162

6.6	Classificazione IRIS	163
6.7	Analisi statistica	163
6.8	Bibliografia	164
Capitolo 7. Risultati		
7.1	Risultati	169
7.2	Dimetilarginine SDMA e ADMA	170
Capitolo 8. Discussione e conclusioni		
8.1	Discussione	177
8.2	Conclusioni	182
8.3	Bibliografia	183

Ringrazio il professore Giuseppe Cringoli che ci ha guidato in questo percorso di dottorato ricco di momenti di crescita ed il mio tutor, il professore Gaetano Oliva, per il suo costante supporto e per avermi dato sempre la massima libertà di scelta.

Un ringraziamento particolare è per i professori Diego Piantedosi e Paolo Ciaramella, i quali hanno lavorato al mio fianco, giorno per giorno, per realizzare il nostro progetto di tesi, stimolandomi a dare sempre il meglio.

Ringrazio vivamente il professore Tommaso Furlanello, perché grazie alla sua collaborazione è stato possibile realizzare uno studio innovativo e di più ampie vedute.

Ringrazio di cuore coloro che hanno preso parte attivamente alle diverse fasi: il dr. Luigi Auletta per la scrupolosa elaborazione statistica dei dati e la sua disponibilità; la studentessa Maristella Filosa per la sua dedizione e la sua spiccata capacità organizzativa; la dr.ssa Angela de Rosa per il suo aiuto concreto e costante ed i laboratoristi Paolo Muzji, Graziano Balestra e Antonio Sica per il loro fondamentale lavoro di analisi.

Un ringraziamento doveroso va a tutti i proprietari dei pazienti che hanno partecipato, nel meglio delle loro possibilità, a questo studio longitudinale decisamente impegnativo; alla Clinica Vet For Life che ci ha sostenuto, con estrema apertura, in un momento difficile come quello vissuto durante il crollo del nostro luogo di lavoro, l'unità di Clinica Medica; e a tutti coloro che, nel momento del bisogno, ci sono sempre stati: il prof. Meomartino, la prof.ssa Ferrante, la prof.ssa Cortese, la prof.ssa Fogliamanzillo, la dr.ssa Gizzarelli, il dr. di Loria, il dr. Tranchese il dr. Guccione, la prof.ssa Rinaldi e il dr. d'Andrea.

Inoltre ringrazio i grafici Claudia Noli e Antonio Massa che, in brevissimo tempo, hanno realizzato la copertina della mia tesi e la dr.ssa Cagiano per il paziente sostegno per la parte burocratica.

Infine i ringraziamenti più importanti. Alla mia famiglia, punto di riferimento della mia vita che mi ha dato la forza e trasmesso i giusti valori per andare sempre avanti, nonostante le difficoltà.

(e)GFR	(estimated) Glomerular Filtration Rate
A II	Angiotensina II
Ac-SDMA	Symmetric N-alfa- Acetyldimethylarginine
ACE	Enzima Angiotensina Convertente
ACS	Acute Coronary Syndrome
ACVIM	American College of Veterinary Internal Medicine
ADH	Anti Diuretic Hormone
ADHF	Acute Decompensated Heart Failure
ADMA	Asymmetric Dimethylarginine (Dimetilarginina asimmetrica)
AGXT2	Alanine Glyoxylato amino Trasnferasi 2
AKI	Acute Kidney Injury
ANP	Peptide Natriuretico Atriale
AO Vmax	Velocità di picco della polmonare con relativo gradiente pressorio
ARF	Acute Renal Failure
As/Ao	Atrio sinistro/ Aorta
BCS	Body Condition Score
BNP	Peptide Natriuretico Cerebrale
BUN	Blood Urea Nitrogen
CHF	Congestive Heart Failure
CKCS	Cavalier King Charles Spaniel
CKD	Chronic Kidney Disease (malattia renale cronica)
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
CMD	Cardiomiopatia dilatativa
CO	Output Cardiaco
CRT	Chordae Tendineae Rupture
CTGF	Connective Tissue Growth Factors
cTnI	Troponina I cardiaca
CVD	Chronic Valvular Disease (malattia valvolare cronica)
CvRD	Cardiovascular – Renal Disorders (Disordini cardiovascolari- renali)
CvRDh	Cardiovascular – Renal Disorders (heart)
CvRDk	Cardiovascular – Renal Disorders (kidney)
CvRDo	Cardiovascular – Renal Disorders (other)
CW	Continuous-Wave
Cys C	Cistatina C
DDAH	Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase
DdVS	Diametro interno del ventricolo sinistro in diastole

DEXA	Dual Energy-X Absorptiometry
DMGV'	Symmetric-keto-d-(dimethylguanidino) Valeric Acid
DS	Deviazione Standard
DsVS	Diametro interno del ventricolo sinistro in sistole
E/A	Rapporto onda E/ onda A
EDV	Volume tele-diastolico del ventricolo sinistro
EDV-I	Indice del volume tele-diastolico
eNOS	endothelial Nitric Oxid Synthasis
EPO	Eritropoietina
ESV	Volume tele-sistolico del ventricolo sinistro
ESV-I	Indice del volume tele-sistolico
FA	Fibrillazione Atriale
FA	Frazione di accorciamento
FE	Frazione di eiezione
FI-PP	Frazione d'ispessimento della parete libera posteriore
FI-SIV	Frazione d'ispessimento del setto interventricolare
GC	Control Group (Gruppo controllo)
GC/MS	Gas-Cromatografia/Spettrometria di Massa
GGT	Urine Gamma-Glutamyl Transpeptidase
GP	Pathological Group (Gruppo patologici)
IL- 6	Interleuchina-6
IL-18	Interleuchina-18
IRIS	International Renal Interest Society
ISACHC	International Small Animal Cardiac Health Council
IVS	Ipertrafia Ventricolare Sinistra
KIM	Kidney Injury Molecule-1
LC-MS	Cromatografia Liquida- Spettrometria di Massa
LC-MS/MS	Cromatografia Liquida- Spettrometria di Massa tandem
LDL	Low Density Lipoprotein
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
MCP -1	Membrane Cofactor Protein-1
MCS	Muscle Condition Score
MMP-3	Metalloproteinasi 3
MR	Rigurgito Mitralico
MVL	Lembo Valvolare Mitralico
NAG	N-acetil-b-(D) Glucosaminidasi
NGAL	Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin
NKF	National Kidney Foundation

NMMA	N-monometilarginina
NO	Nitric Oxid (Ossido di azoto)
NT-proANP	Frammento N-terminale dell'ANP
NT-proBNP	Frammento N-terminale del BNP
OMS	Organizzazione Mondiale della Sanità
PA Vmax	Velocità di picco dell'aorta con relativo gradiente pressorio
PAD	Pressione Arteriosa Diastolica
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor
PAM	Pressione Arteriosa Media
PAS	Pressione Arteriosa Sistolica
PDE-III	Fosfodiesterasi-III
PPd	Spessore della parete libera posteriore in diastole
PPs	Spessore della parete libera posteriore in sistole
PRMTs	Enzimi N-metiltransferasi proteiche
PTH	Paratormone
PU/CU	Proteine Urinarie/Creatinina Urinaria
PUFA	Acidi grassi polinsaturi
PW	Pulsed-Wave
RAAS	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone
RBF	Renal Blood Flow
RBP	Urine Retinol-Binding Protein
RD	Disfunzione renale
rHuEPO	Eritropoietina ricombinante umana
ROS	Specie Reattive dell'Ossigeno
SCR	Cardio Renal Syndrome (Sindrome Cardio-renale)
sCR	Creatinina sierica
SDMA	Symmetric Dimethylarginine (Dimetilarginina simmetrica)
SHT	Systemic Hypertension
SIVd	Spessore del setto interventricolare in diastole
SIVs	Spessore del setto interventricolare in sistole
TDE	Tempo di decelerazione dell'onda E
TGF- β -3	Fattore di crescita trasformante beta
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alfa
TOD	Target Organ Damage
VHS	Vertebral Heart Score
VIC	Cellule Valvolari Interstiziali
WRF	Worsening Renal Function
WSAVA	World Small Animal Veterinary Association
XLHN	X-Linked Hereditary Nephropathy

- 1.1 Preparato anatomico di valvola mitralica canina
- 1.2 Fotomicrografia di una sezione di lembo valvolare mitralico (MVL) con lieve degenerazione mixomatosa e disorganizzazione del collagene
- 1.3 Sezione anatomica di valvola mitralica canina, affetta da degenerazione mixomatosa
- 1.4 Schema classico dell'attivazione del RAAS e degli effetti multipli dell'A II
- 1.5 Proiezioni radiografiche latero-laterale (A) e ventro-dorsale (B) del torace di un cane con edema polmonare cardiogeno diffuso
- 1.6 Sopravvivenza in 558 cani con CVD con rapporto As/Ao inferiore a 1.7 e in cani con rapporto As/Ao superiore di 1.7
- 1.7 Ingrandimento atriale sinistro in un cane con CVD
- 1.8 Scansione parasternale destra in asse lungo in un CKCS di 5 anni con CVD
- 1.9 Flutter atriale in un cane
- 1.10 Proiezione radiografica laterale destra di versamento pericardico acuto in un cane
- 1.11 Proiezione ecocardiografica parasternale destra asse lungo
- 2.1 Medullary rim sign nel rene di un gatto
- 2.2 Immagine ecografica di pielonefrite
- 2.3 Immagine radiografica di calcoli renali
- 2.4 Immagine di microscopia ottica di danno tubulo-interstiziale grave con atrofia e dilatazione tubulare, infiltrazione di cellule mononucleate e fibrosi interstiziale
- 2.5 Concentrazioni di sCr valide per la stadiazione della CKD nei cani di media taglia (variabili per cani di grossa taglia).
- 2.6 Stadiazione in base al rapporto PU/CU
- 2.7 Classificazione IRIS in base alla PAS
- 3.1 Struttura molecolare delle arginine metilate (ADMA e SDMA)
- 3.2 Sintesi e metabolismo della SDMA e dell'ADMA
- 3.3 Meccanismi fisiopatologici che evidenziano l'associazione tra i livelli sierici delle dimetilarginine ed il danno vascolare/renale.
- 3.4 Fattori che aumentano o diminuiscono la GFR e che alterano i biomarker di funzionalità renale
- 3.5 Pathway biochimico di produzione, eliminazione e degradazione di ADMA
- 3.6 Concentrazione sierica canina di SDMA (LC-MS) (mg/dl) tracciata sull'asse delle x rispetto alla proporzione della

- popolazione di riferimento di cani adulti sani (n= 122) sull'asse delle y
- 3.7 Livelli di SDMA sierico felino, tracciati sull'asse delle x, in confronto con la popolazione di riferimento di gatti adulti sani (n= 86) sull'asse delle y
- 3.8 Classificazione IRIS 2015 aggiornata
- 4.1 Sindrome Cardio-Renale tipo 1
- 4.2 Sindrome Cardio-Renale tipo 2
- 4.3 I meccanismi multipli che spiegano i potenziali effetti nocivi dell'aldosterone sul rene
- 4.4 Sindrome Cardio-Renale tipo 3
- 4.5 Sindrome Cardio-Renale tipo 4
- 4.6 Sindrome Cardio-Renale tipo 5
- 4.7 Proposta di classificazione per la SCR
- 5.1 Meccanismi (postulati) alla base dell'interazione tra l'insufficienza cardiaca e la disfunzione renale
- 5.2 Eziologie proposte, possibili o sospette di CvRD
- 5.3 Stadiazione di AKI secondo le linee guida IRIS
- 7.1 Rappresentazione grafica dell'andamento nel tempo di SDMA
- 7.2 Rappresentazione grafica dell'andamento nel tempo di ADMA
- 7.3 Rappresentazione grafica dei livelli di SDMA nelle classi ACVIM a T₀
- 7.4 Rappresentazione grafica dei livelli di ADMA nelle classi ACVIM a T₀
- 7.5 Rappresentazione grafica della correlazione tra SDMA e ADMA
- 7.6 Rappresentazione grafica della correlazione tra SDMA e PU/CU a T₀
- 7.7 Rappresentazione grafica della correlazione tra ADMA e creatininemia a T₁

- 1.1 Linee guida per la diagnosi ed il trattamento della CVD canina
ACVIM consensus statement
- 2.1 a Alcune cause di malattia renale cronica acquisita
- 2.1 b Alcuni esempi di malattia renale cronica congenita o familiare
- 2.2 Classificazione del rischio di danno d'organo
- 2.3 Classificazione degli stati ipertensivi
- 4.1 Classificazione delle sindromi cardio-renali
- 5.1 Test ematologici ed urinari, tradizionali e nuovi per definire il
danno renale
- 6.1 Range di normalità dei parametri renali Crea, BUN e PU/CU
- 7.1 Andamento nel tempo dei parametri di funzionalità renale relativi
alla stadiazione IRIS nel gruppo dei cani cardiopatici, espressi
come media e ds
- 7.2 Livelli di SDMA (ng/ml) e ADMA (µg/ml) nei cani cardiopatici ai
differenti tempi analizzati.

The cardiovascular and renal systems constantly interact both in physiological and pathological conditions. In humans this interaction is defined as Cardio-Renal Syndrome (SCR) and, despite it is well known, is the subject of continuing research. In veterinary medicine only recently it has proposed the definition of "Cardiovascular-Renal Disorders" (CVRD) for dog and cat. Although in human medicine the role of biomarkers of chronic renal failure associated to heart disease has been widely investigated, it has not been established the superiority of a unique parameter, but are used more indicators integrated between them. Similarly, for diagnosis and prognosis of CVRD in dogs are used traditional haematochemical parameters of renal function and also modern potential biomarkers.

In veterinary medicine recent studies have focused on Symmetric dimethylarginine (SDMA), described as a biomarker of early renal damage in dogs and cats; moreover, ADMA (asymmetric isoform of SDMA), is also considered a potential biomarker for endothelial and renal function, although the data available in veterinary literature are very poor.

The aim of the present thesis was to evaluate the role of serum ADMA and SDMA as early biomarkers of CKD in dogs with chronic mitral valve disease (CMVD) at different clinical stage.

Twelve dogs affected by CMVD (Pathological Group - GP) and ten healthy dogs (Control Group - CG) were recruited into the study from the client-owned referral population of the Veterinary Teaching Hospital of Naples University Federico II. The diagnosis of CMVD was confirmed by echocardiography and ECG. The dogs belonging to the GP had not started cardiovascular therapy and showed no signs of renal failure on the base of clinical findings, ultrasound examination, haematochemical parameters and urine analysis. The dogs of GP group were evaluated over time, at inclusion (T_0), at 3 months (T_1) and at 6 months (T_2). In addition, they were classified for CMVD according to the guidelines of the American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) and for renal failure according to the criteria suggested by the International Renal Interest Society (IRIS). For both groups, they were included dogs of both sexes and of all breeds, with body weight up to 25 kg and no older than 12 years; none of the female dogs were pregnant or lactating. Regarding the laboratory analysis, on all animals a blood count and a complete haematochemical panel were performed. Finally, ADMA and SDMA serum concentrations were obtained using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS / MS) at San Marco Veterinary laboratory

(Padova). The obtained data were reported as mean \pm mean standard error mean (SEM). P values < 0.05 were considered significant. The differences between ACVIM classes at T_0 for both SDMA and ADMA were evaluated with non-parametric Kruskal-Wallis test. The differences over time of SDMA and ADMA within the GP has been tested with analysis of variance for repeated measures (RM-ANOVA). The correlations between ADMA, SDMA, echocardiographic parameters, BUN, creatinine and PU/CU ratio within the GP have been assessed by applying Pearson or Spearman test.

In CG, the mean values of the serum concentration of SDMA and ADMA were 223.69 ± 1.11 ng/ml and 113.53 ± 1.10 μ g/ml respectively, exceeding slightly the upper limit of the reference range (<179 ng / ml) suggested for the canine species by the reference laboratory. In GP, the results showed no significant differences over time for SDMA (T_0 : 238.4 ± 26.0 ; T_1 : 149.3 ± 37.9 ; T_2 : 292.2 ± 47.4) as well as between the ACVIM classes at T ; on the contrary, the ADMA values showed a statistically significant decrease between T_0 , T_1 ($P < 0.01$) and T_2 ($P < 0.05$) (T_0 : 1.3 ± 0.2 ; T_1 : 0.4 ± 0.1 ; T_2 : 0.8 ± 0.2). Regarding regression analysis, within GP the SDMA and ADMA were positively correlated at T_0 . In addition, at T_0 the SDMA correlated negatively with the PU/CU, while at T_1 ADMA was positively correlated to creatinine.

The data obtained in our study show a great variability in the values of ADMA and SDMA, both in the control group than in the pathological group; however, both dimethylarginines correlated positively at T_0 in the group of dogs with CMVD. The variability detected in SDMA values in our canine study population could be influence by the kind of diets on the concentration of this dimethylarginine, similar to what recently reported in human and in old dogs.

Furthermore, our results showed no statistically significant difference for SDMA between the two groups at baseline (T_0) and for dogs of GP over time. Similarly, it was not observed any significant change for SDMA between the ACVIM classes at T_0 . These findings may be due to the presence in our study of animals at the early stages of mitral valve disease (ACVIM classes B1 and B2), in which probably renal function has not yet been compromised and is not present a glomerular filtration rate (GFR) reduction.

Finally, in our study ADMA values, in animals with CVD, showed a significant decrease over time, probably due to the influence of some factors such as diet and the use of cardiovascular drugs such as the ACE

inhibitors, that may have a protective action on the endothelium against oxidative stress.

In conclusion, on the base of our results we can hypothesize that blood levels of SDMA does not significantly change in early stages of CVD, in which there are no significant hemodynamic changes. As well as, it is likely that the ADMA decreasing is not due to hemodynamic factors, but probably it is influenced by other factors, that interfere with oxidative stress in dogs with CVD.

La malattia valvolare cronica (CVD) rappresenta la patologia cardiaca acquisita più comune nel cane, con una prevalenza variabile con l'età e che nei cani anziani di piccola taglia raggiunge quasi il 100%. Analogamente la malattia renale cronica (CKD) è la patologia renale più comunemente riscontrata nella specie canina, con una prevalenza stimata dello 0,5-1%.

L'apparato cardiovascolare ed il sistema renale interagiscono costantemente tra loro sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Nell'uomo tale interazione viene definita come Sindrome Cardio-Renale (SCR) e, nonostante le numerose conoscenze già acquisite, è ancora oggi oggetto di continue ricerche. In campo veterinario solo recentemente sono state create delle linee guida che hanno proposto la definizione di "Disordini Cardiovascolari-Renali" (CvRD) per il cane ed il gatto.

Nonostante in medicina umana il ruolo dei biomarker di insufficienza renale cronica in corso di patologie cardiache sia stato ampiamente studiato, ancora non è stato individuato un unico parametro, ma sono necessari più indicatori ad integrazione della valutazione clinica complessiva del paziente. Analogamente, nell'ambito delle CvRD del cane non esistono, ad oggi, test specifici, per cui si ricorre sia ai parametri ematobiochimici di funzionalità renale e cardiaca standard che a quelli più avanzati.

Tra questi ultimi, in campo veterinario, recenti ricerche hanno focalizzato l'attenzione sulla Dimetilarginina Simmetrica (SDMA), un derivato metilato dell'arginina, recentemente definito come un biomarker precoce di insufficienza renale cronica (CKD) nel cane e nel gatto. Inoltre, l'interesse dei ricercatori è stato attirato dall'ADMA (isoforma asimmetrica della SDMA), considerata anch'essa un valido biomarker di disfunzione endoteliale e di funzionalità renale, sebbene i dati disponibili in veterinaria siano molto scarsi.

Lo scopo della presente tesi è stato quello di valutare il possibile utilizzo della concentrazione sierica di SDMA e ADMA come biomarker precoce di CKD in cani affetti da malattia mitralica cronica a diverso stadio clinico al fine di definire meglio, in questa specie, la sindrome cardio-renale.

Per la realizzazione del nostro studio, nell'ambito dei cani affetti da malattia mitralica cronica (CVD), condotti a visita presso il Servizio di Cardiologia dell'Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD) dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, sono stati selezionati 12 animali (Gruppo Patologici- GP). La diagnosi di malattia mitralica cronica veniva confermata attraverso rilievi clinici e strumentali, principalmente radiologici ed ecocardiografici. I cani appartenenti al GP erano tutti esenti

da terapia cardiovascolare e non presentavano alcun segno di insufficienza renale sulla base dei rilievi clinici, dell'esame ecografico, dei parametri ematobiochimici e dell'esame chimico-fisico delle urine.

Gli animali cardiopatici sono stati valutati nel tempo, ovvero al momento dell'inclusione (T_0), a 3 mesi (T_1) e a 6 mesi (T_2). Inoltre, essi venivano classificati al T_0 e, ai successivi controlli, secondo i criteri di stratificazione dell'insufficienza mitralica indicati dall'*American College of Veterinary Internal Medicine* (ACVIM) e secondo i criteri di classificazione dell'insufficienza renale suggeriti dalla *International Renal Interest Society* (IRIS). Allo stesso modo, nell'ambito della popolazione generale canina condotta a visita presso lo stesso ospedale, sono stati selezionati 10 cani sani, come gruppo di controllo (C). Per entrambi i gruppi, sono stati inclusi cani di ambo i sessi e di ogni razza, con peso non superiore ai 25 kg ed età non superiore ai 12 anni; nessuno dei cani di sesso femminile era in gravidanza o in lattazione.

Per quanto riguarda le analisi di laboratorio, su tutti i soggetti di entrambi i gruppi, è stato eseguito un esame emocromocitometrico ed un profilo ematobiochimico completi; infine sono state dosate le dimetilarginine (SDMA e ADMA) tramite il metodo di cromatografia liquida-spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS), presso il Laboratorio Veterinario San Marco di Padova.

I dati ottenuti sono stati riportati come media \pm errore standard della media (SEM). La normalità dei dati è stata testata mediante test *W* di Shapiro-Wilk. Il livello di significatività è stato posto per tutti i test utilizzati a $P < 0,05$. Le differenze tra le classi ACVIM a T_0 sia per SDMA sia per ADMA sono state valutate con test non parametrico di Kruskal-Wallis. L'andamento nel tempo di SDMA e ADMA entro il gruppo P è stato testato con un'Analisi della Varianza per Misure Ripetute (RM-ANOVA).

Le correlazioni tra SDMA o ADMA e parametri ecocardiografici, BUN, Creatininemia e PU/CU entro il gruppo P sono state esplorate applicando i test di Pearson o di Spearman.

Per quanto riguarda i soggetti appartenenti al GC, i valori medi della concentrazione sierica di SDMA, espressi in ng/ml, e di ADMA, espressi in $\mu\text{g/ml}$, erano rispettivamente di $223,69 \pm 113,53$ e di $1,11 \pm 1,10$, superando di poco il limite superiore del range di riferimento (<179 ng/ml) utilizzato per la specie canina, fornito dal Laboratorio Veterinario San Marco (Padova).

Nel gruppo GP, i risultati ottenuti non hanno mostrato differenze significative nell'andamento nel tempo della SDMA (T_0 : $238,4 \pm 26,0$; T_1 :

149,3 ± 37,9; T₂: 292,2 ± 47,4), così come tra le classi ACVIM a T₀; al contrario, i valori dell'ADMA decrescevano in modo statisticamente significativo tra T₀, T₁ (P<0,01) e T₂ (P<0,05) (T₀: 1,3 ± 0,2; T₁: 0,4 ± 0,1; T₂: 0,8 ± 0,2). Per quanto riguarda l'analisi di regressione, nel **GP** la SDMA e l'ADMA erano correlate positivamente a T₀. Inoltre, a T₀ la SDMA correlava negativamente con il PU/CU, mentre a T₁ l'ADMA era correlata positivamente alla creatinina.

I dati ottenuti nel nostro studio mostrano una grande variabilità per i valori di SDMA e ADMA, sia nel gruppo controllo che nel gruppo dei soggetti cardiopatici; tuttavia, entrambe le dimetilarginine correlavano positivamente al momento dell'arruolamento (T₀) nel gruppo patologici. La variabilità rilevata nei valori di SDMA potrebbe essere causata dall'influenza della dieta sulla concentrazione di tale dimetilarginina. I nostri risultati non hanno evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa nelle concentrazioni ematiche di SDMA sia tra i due gruppi al momento dell'arruolamento (T₀) sia nel tempo. Analogamente, non è stata osservata alcuna variazione significativa per SDMA tra le diverse classi ACVIM, a T₀ e nei successivi controlli. Tale andamento può essere dovuto al fatto che nel nostro studio sono stati arruolati principalmente animali in fase iniziale di malattia mitralica (classi ACVIM B1 e B2). I valori di ADMA riscontrati negli animali cardiopatici mostravano una significativa riduzione nel tempo, probabilmente a causa dell'influenza di alcuni fattori quali l'alimentazione e le terapie somministrate.

In conclusione, potremmo ipotizzare che i livelli ematici di SDMA non si modificano sensibilmente nelle fasi iniziali di malattia mitralica cronica, nelle quali non si osservano modificazioni emodinamiche significative. Così come, è verosimile che l'ADMA non si modifichi a causa di fattori emodinamici, ma sia influenzato da altri fattori (alimentazione, terapie specifiche, etc.) che interferiscono con la condizione di stress ossidativo nel paziente cardiopatico.

La malattia valvolare cronica (Chronic Valvular Disease) rappresenta la malattia cardiaca acquisita più comune nel cane, con una prevalenza variabile con l'età e che nei cani anziani di piccola taglia raggiunge quasi il 100% (Borgarelli e Crosara, 2012).

Analogamente la malattia renale cronica (Chronic Kidney Disease) è la patologia renale più comunemente riscontrata sia nel cane che nel gatto e la sua prevalenza complessiva stimata è dello 0,5-1% nei cani e dell'1-3% nei gatti (Polzin, 2015; Grauer, 2016).

Entrambe le affezioni sono ormai ben identificate e studiate nel cane e nel gatto, dato il loro comune riscontro nella pratica clinica veterinaria, ma soprattutto perché costituiscono un'importante causa di morbidità e mortalità in tali specie (Fleming *et al.*, 2011; Pouchelon *et al.*, 2015).

L'apparato cardiovascolare ed il sistema renale interagiscono costantemente tra loro sia in condizioni fisiologiche che patologiche (Pouchelon *et al.*, 2015); nell'uomo questa interazione viene definita come Sindrome Cardio-Renale (SCR), ovvero un complesso di "patologie del cuore e del rene, in cui la disfunzione acuta o cronica di uno dei due organi, induce una disfunzione acuta o cronica nell'altro".

In medicina umana, la classificazione più comunemente utilizzata permette di individuare cinque tipologie di SCR, delle quali la Tipo 1 e la Tipo 2 riconoscono come causa scatenante lo scompenso cardiaco (acuto o cronico), mentre per la SCR di Tipo 3 e quella di Tipo 4 la causa iniziale è un danno renale (acuto o cronico). La SCR di Tipo 5 è, invece, correlata ad un ampio spettro di patologie sistemiche che influenzano entrambi i sistemi, cardiovascolare e renale (Di Lullo *et al.*, 2013).

Hatamizadeh e collaboratori hanno proposto una classificazione alternativa della SCR che potrebbe costituire un valido ausilio per l'individuazione di precisi target terapeutici e corrette procedure diagnostiche. Tale stadiazione individua 7 tipologie di pazienti, in base alla loro manifestazione clinica prevalente: tipologia "emodinamica", "uremica", "vascolare", "neuromorale", "da anemia e/o metabolismo del ferro", "metabolismo minerale" e "malnutrizione-infiammazione-cachessia" (Hatamizadeh *et al.*, 2013; Obi *et al.*, 2016).

Nonostante in medicina umana si parli di una cosiddetta 'doppia epidemia' di insufficienza cardiaca ed insufficienza renale (Pokhrel *et al.*, 2008), molti aspetti della SCR non sono ancora completamente chiariti e necessitano di ulteriori ricerche sia di carattere sperimentale che clinico pratico (Braam *et al.*, 2014).

In medicina veterinaria, il complesso rapporto di interdipendenza esistente tra i due apparati (cardiovascolare e renale) è stato approfondito solo in tempi più recenti; in particolare nel 2015, è stato creato un *Cardio Renal Syndrome Consensus Group*, al fine di sviluppare delle linee guida nella specie canina, di aumentare la consapevolezza dell'importanza che tale sindrome riveste nei piccoli animali e stimolare sempre nuove ricerche (Pouchelon *et al.*, 2015). La definizione utilizzata è quella di “disordini cardiovascolari-renali” (Cardiovascular-renal disorders, CvRD), ovvero l'insieme di “patologie e/o danni strutturali/funzionali (indotti da tossine o farmaci) dell'apparato cardiovascolare o del rene, che alterano le normali interazioni tra i due sistemi e che portano al malfunzionamento di uno o di entrambi gli organi interessati”. Nel cane, a differenza dell'uomo, le CvRD sono state suddivise in 3 sottogruppi: CvRD_h, da cuore (heart) in cui la causa iniziale è di origine cardiaca; CvRD_k, da rene (kidney) ovvero l'incipit della sindrome è un danno renale ed infine CvRD_o, da altre cause (other) laddove una qualsiasi patologia sistemica provochi una disfunzione renale e/o cardiovascolare (Pouchelon *et al.*, 2015).

La SCR tipo 2, descritta nell'uomo, è la condizione che più si avvicina alle situazioni che il medico veterinario può trovarsi ad affrontare nella pratica clinica (Ronco, 2011); mentre nell'uomo la malattia renale cronica ha una prevalenza stimata del 45-63% in pazienti affetti da insufficienza cardiaca cronica, nel cane non è ancora possibile quantificare esattamente la presenza di disfunzioni renali in corso di insufficienza cardiaca cronica. Tuttavia è stata stimata la prevalenza dell'aumento di azotemia in cani affetti da patologie cardiache, che varia tra il 7,4 e il 24,1% (Nicolle *et al.*, 2007; Martinelli *et al.*, 2016); in aggiunta, un report del 2010 ha rilevato che il 24,1 % di 223 cani affetti da patologia cardiaca mostrava valori elevati di creatininemia, sebbene la prevalenza di insufficienza cardiaca congestizia, in questo gruppo di pazienti, non fosse stata specificata (Stepien 2011). Nonostante in medicina umana il ruolo dei biomarker di insufficienza renale cronica in corso di patologie cardiache sia stato ampiamente studiato (Ronco *et al.*, 2010; Brisco e Testani, 2014), ancora non è stato individuato un unico biomarker per ogni tipo di SCR, ma sono necessari più parametri ad integrazione della valutazione clinica complessiva del paziente (Pinheiro da Silva e Vaz da Silva, 2016). Analogamente, nell'ambito delle CvRD del cane non esistono, ad oggi, test specifici, per cui si ricorre sia ai parametri ematobiochimici di funzionalità renale e cardiaca standard che a quelli più avanzati. Tra i nuovi potenziali biomarker di funzionalità renale, in veterinaria, sono state indagate la

cistatina C e la Dimetilarginina Simmetrica (SDMA) in cani affetti da insufficienza cardiaca da malattia valvolare cronica, al fine di verificare l'andamento della Glomerular Filtration Rate (GFR) (Pouchelon *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2016).

Unitamente alla SDMA, in medicina umana si è soliti dosare anche l'isomero asimmetrico della Dimetilarginina (ADMA) che rappresenta sia un biomarker di disfunzione endoteliale sia un parametro predittivo della progressione del danno renale (Schwedhelm e Böger, 2011). In medicina veterinaria, è stato dimostrato che le concentrazioni di ADMA aumentano in gatti affetti da CKD, correlandosi, seppur moderatamente, con la creatininemia (Hall *et al.*, 2014 a). In aggiunta, sono state valutate la prevalenza della CKD e dell'anemia cardio-renale in cani affetti da CVD, con riferimento anche ad una possibile correlazione tra la classificazione ACVIM relativa alla CVD e quella dell'*International Renal Interest Society* (IRIS) riguardante la CKD (Martinelli *et al.*, 2016). Data l'importanza di poter fare una diagnosi precoce di insufficienza renale nei cani più a rischio, come quelli affetti da CVD, è auspicabile che la ricerca in questo campo prosegua, perseguendo non solo l'obiettivo di stratificare i pazienti sulla base dei biomarker disponibili, ma anche quello di individuare quale tra essi possa consentire migliori prospettive diagnostiche, terapeutiche e prognostiche.

Considerando le premesse, lo scopo della presente tesi è stato quello di valutare il possibile utilizzo della concentrazione sierica di SDMA e ADMA come biomarker precoce di CKD in cani affetti da malattia mitralica cronica a diverso stadio clinico al fine di poter aiutare il medico veterinario ad inquadrare meglio la Sindrome Cardio-Renale, al pari di quanto descritto in medicina umana.

La parte sperimentale sarà preceduta da una descrizione degli aspetti eziopatogenetici e clinico-diagnostici della malattia mitralica cronica, della malattia renale cronica e della Sindrome Cardio-Renale, al fine di una migliore disamina dell'argomento.

- Borgarelli M e Crosara S. Malattia cronica mitralica. In: Santilli RA, Bussadori C, Borgarelli M. Manuale di cardiologia del cane e del gatto. 1st ed. Elsevier 2012; pag. 153-164.
- Braam, B, Joles JA, Danishwar AH, *et al.* Cardiorenal syndrome – current understanding and future perspectives. *Nature Reviews Nephrology* 2014; 10:48-55.
- Brisco MA e Testani JM. Novel Renal Biomarkers to Assess Cardiorenal Syndrome. *Current Heart Failure Reports* 2014; 11(4): 485–499.
- Choi BS, Moon HS, Seo SH e Hyun C. Evaluation of serum cystatin-C and symmetric dimethylarginine concentrations in dogs with heart failure from chronic mitral valvular insufficiency. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2016; 79(1):41-46.
- Di Lullo L, Floccari F, De Pascalis A, Marinelli A *et al.* Fisiopatologia e diagnosi della sindrome cardio-renale: stato dell'arte e prospettive future. *Giornale Italiano di Nefrologia* 2013; 30 (5):1-29.
- Fleming JM, Creevy KE & Promislow DE. Mortality in North American dogs from 1984 to 2004: an investigation into age-, size-, and breed-related causes of death. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2011; 25:187-198.
- Grauer GF. Use of Serum Creatinine & Symmetric Dimethylarginine. *Today's Veterinary Practice* typjournal.com. March/April 2016.
- Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M and Jewell DE. Comparison of Serum Concentrations of Symmetric Dimethylarginine and Creatinine as Kidney Function Biomarkers in Cats with Chronic Kidney Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2014 a; 28:1676–1683.
- Hatamizadeh P, Fonarow GC, Budoff MJ *et al.* Cardiorenal syndrome: pathophysiology and potential targets for clinical management. *Nature Reviews Nephrology* 2013; 9(2):99-111.
- Martinelli E, Locatelli C *et al.* Preliminary Investigation of Cardiovascular–Renal Disorders in Dogs with Chronic Mitral Valve Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2016; 30:1612–1618.
- Nicolle AP, Chetboul V, Allerheiligen T, *et al.* Azotemia and glomerular filtration rate in dogs with chronic valvular disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2007; 21:943-949.
- Obi Y, Kim T, Saba P, Kovesdy CP, Amin AN e Kalantar-Zadeh K. Current and Potential Therapeutic Strategies for Hemodynamic Cardiorenal Syndrome. *Cardiorenal Medicine* 2016; 6: 83–98
- Pinheiro da Silva AL e Vaz da Silva MJ. Type 4 cardiorenal syndrome.

- Revista Portuguesa de Cardiologia 2016; 35(11):601-616.
- Pokhrel N, Maharjan N, Dhakal B, *et al.* Cardiorenal syndrome: A literature review. *Experimental and Clinical Cardiology* 2008; 13:165–170.
- Polzin DJ. Chronic Kidney Disease. In: Ettingher SJ, Feldman EC, editors. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 7th ed. St. Louis: Elsevier Saunders 2015; pag. 1990- 2021.
- Pouchelon JL, Atkins CE, Bussadori C, Oyama MA *et al.* Cardiovascular–renal axis disorders in the domestic dog and cat: a veterinary consensus statement. *Journal of Small Animal Practice* 2015; 56, 537–552.
- Ronco C, McCullough P, Anker SD, Anand I, Aspromonte A *et al.* Cardio-renal syndromes: report from the consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative. *European Heart Journal* 2010; 31: 703–711.
- Ronco C. Cardio renal syndrome, what is behind it? *Cardio-renal syndromes: lessons from human pathophysiology* 2011; pag. 64-67. <http://cardiosymposium2011.ceva.com/>
- Schwedhelm E e Böger RH. The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease. *Nature Reviews Nephrology* 2011; 7:275–85.
- Stepien R. Cardio renal syndrome, what is behind it? A rock and a hard place: cardiorenal syndrome in clinical canine veterinary patients 2011; pag. 58-62. <http://cardiosymposium2011.ceva.com/>

Capitolo 1

Malattia cronica mitralica nel cane

1.1 Anatomia e fisiologia dell'apparato mitralico nel cane

La valvola mitralica è un complesso apparato costituito dai lembi valvolari, le commissure valvolari, l'*annulus* mitralico, le corde tendinee e i muscoli papillari. L'*annulus* fibroso atrioventricolare è un anello costituito da collagene che delimita e sostiene l'ostio valvolare, con caratteristiche morfo-strutturali differenti nelle varie specie; nel cane questa sembra avere una morfologia predominante variabile da ellittica a circolare (Borgarelli e Crosara 2012); tuttavia, un recente studio sull'applicabilità dell'ecocardiografia 3D transtoracica *real time* nel cane ha dimostrato, per la prima volta, che la valvola mitralica, in soggetti sani, ha una forma a sella (*saddle-shaped*) (Menciotti *et al.*, 2016).

All'*annulus* sono ancorati i lembi valvolari, strutture sottili e traslucide, che si distinguono in anteriore (o settale) e posteriore (o murale o parietale) (Abbott 2008; Borgarelli e Crosara, 2012). Nell'uomo, essi differiscono per la lunghezza d'inserzione sull'*annulus* e per la distanza da questo al margine libero, infatti, il lembo anteriore ha una lunghezza di inserzione minore del lembo posteriore, ma una maggiore distanza (quasi il doppio) della porzione libera; ne risulta che le superfici dei lembi sono equiparabili e complessivamente superano quella dell'ostio atrioventricolare (**Fig. 1.1**) (Borgarelli *et al.*, 2011).

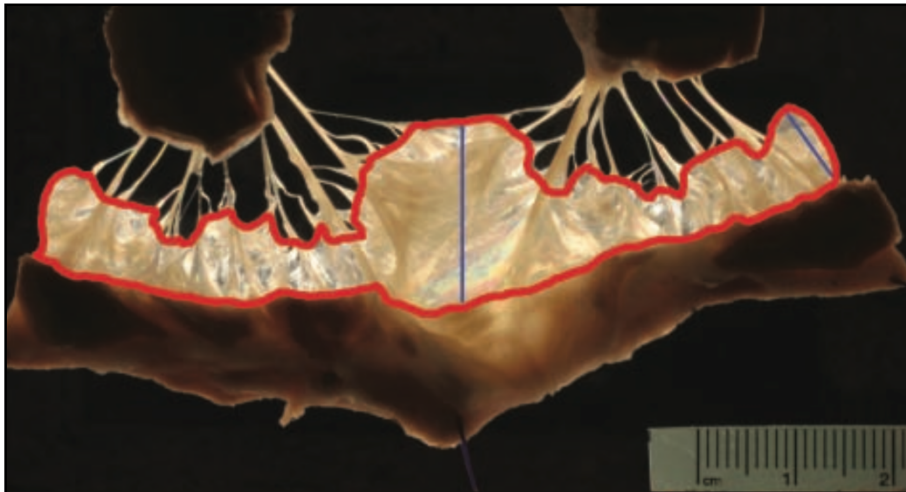


Fig.1.1 Preparato anatomico di valvola mitralica canina. Si evidenzia la lunghezza del lembo mitralico anteriore (linea blu lunga) e del lembo mitralico posteriore (linea blu corta) (Modificato da Borgarelli *et al.*, 2011).

Nel cane è stato riportato che l'area dell'*annulus* e quella dei lembi valvolari, sono correlate positivamente con il peso corporeo. Tuttavia, l'area dei lembi valvolari, eccedente quella dell'*anulus*, aumenta in misura minore con l'aumentare del peso del soggetto; per cui si suppone che, nei cani di grossa taglia, anche un lieve grado di dilatazione dell'*anulus* o di degenerazione valvolare, possano indurre un deficit nella coaptazione dei lembi, tale da causare una significativa insufficienza mitralica (Borgarelli *et al.*, 2011).

I muscoli papillari del ventricolo sinistro sono due: il muscolo papillare dorsale (o caudale o subatriale) ed il muscolo papillare ventrale (o craniale o subauricolare); da essi originano le *chordae tendineae* (primarie) che si arborizzano in corde tendinee secondarie e terziarie che, a loro volta, terminano nella zona ruvida di entrambi i lembi valvolari (Borgarelli *et al.*, 2011; Borgarelli e Crosara, 2012). I muscoli papillari e le corde tendinee costituiscono, insieme, l'apparato di tensione della valvola mitrale (Borgarelli *et al.*, 2011); nel cane il numero delle corde tendinee varia da 48 a 74, distribuendosi in numero maggiore al lembo anteriore, rispetto a quello posteriore (Borgarelli e Crosara, 2012).

All'esame istologico è possibile identificare la stratificazione della valvola mitralica del cane, in cui si distingue innanzitutto una parte centrale fibrosa (collagene) parallela alla valvola e che si estende nelle corde tendinee; sul versante atriale della fibrosa, vi è una quantità variabile di tessuto connettivo liscio (spongiosa), mentre entrambi i lati della valvola sono rivestiti da uno strato fibroelastico, ricoperto a sua volta da endotelio.

Le fibre muscolari si estendono più o meno distalmente dal margine d'inserzione sulla valvola e, insieme ad una diffusa rete di fibre nervose simpatiche, consentono il normale funzionamento dell'apparato mitralico (Borgarelli *et al.*, 2011).

Il corretto funzionamento dell'apparato mitralico presuppone un'impeccabile sinergia tra caratteristiche morfologiche e funzionali delle componenti descritte, nonché la presenza di un normale flusso transmitralico; questo, correlato ad un gradiente pressorio atrioventricolare, consente l'apertura passiva della valvola mitrale.

Oltre a caratteristiche morfologiche ben definite, l'*anulus* mitralico presenta movimenti caratteristici che rendono ottimale il suo funzionamento. In particolare, sono stati descritti due movimenti principali: uno spostamento dell'*anulus* verso l'apice cardiaco durante la sistole, che favorisce il riempimento atriale; ed un moto in direzione opposta durante la diastole, per facilitare, invece, il riempimento diastolico

ventricolare. Tali movimenti dipendono, a loro volta, dalla funzione ventricolare sinistra; infatti, quando questa è depressa, il *recoil* elastico ventricolare diminuisce e si verifica un ritardo nella chiusura dei lembi valvolari (Borgarelli e Crosara, 2012).

Durante i movimenti dell'anulus in sistole, la coaptazione dei lembi valvolari avviene anche grazie all'azione combinata dei muscoli papillari e delle corde tendinee; per esercitare una forza ottimale sui lembi mitralici, il sistema di tensione dei muscoli papillari-corde tendinee deve essere allineato verticalmente con l'anulus mitralico (Borgarelli *et al.*, 2011). Tuttavia, in corso di rimodellamento cardiaco, queste strutture possono subire delle alterazioni, ovvero i muscoli papillari possono dislocare trasversalmente alla parete ventricolare, alterando la trazione sulle corde tendine e rendendo progressivamente, insufficiente l'intero apparato valvolare. Infine, offrono il loro contributo le correnti di Eddy, movimenti vorticosi del sangue che, dirigendosi dalla superficie atriale a quella ventricolare, favoriscono una chiusura precisa dei lembi valvolari (Borgarelli e Crosara, 2012).

1.2 Definizione ed eziologia della malattia cronica mitralica

La malattia cronica della valvola mitralica è una patologia valvolare acquisita, caratterizzata da una degenerazione progressiva di tipo mixomatoso dei lembi valvolari (Abbott, 2008; Borgarelli e Crosara, 2012). La sua eziologia non è stata ancora del tutto chiarita, ma l'ipotesi più accreditata è quella multifattoriale. La prima componente eziologica, descritta per la prima volta nel Cavalier King Charles Spaniel e, in seguito confermata nel Bassotto, è quella ereditaria (Olsen *et al.*, 1999; Lewis *et al.*, 2011; Borgarelli e Crosara, 2012), infatti vi è un'alta prevalenza della patologia in alcune razze (soprattutto di piccola taglia), in cui la natura poligenica della malattia deve raggiungere una certa soglia di espressione, prima di rivelarsi clinicamente. I maschi presentano tale soglia più bassa rispetto alle femmine, per cui essi esprimono la malattia più precocemente (Abbott, 2008; Atkins *et al.*, 2009; Olsen *et al.*, 2015).

A questa si assocerebbe, inoltre, un insieme di fattori quali: l'anatomia stessa dell'apparato mitralico, il grado di obesità e di esercizio fisico, che possono contribuire alla manifestazione della CVD. Un'altra ipotesi, largamente riconosciuta, si basa sull'esistenza di un evento iniziale scatenante, identificato per molto tempo con lo stress a cui la valvola è ripetutamente sottoposta, soprattutto nella zona di apposizione dei lembi;

la conseguenza è un continuo processo di insulto e riparazione della valvola, che induce ad una progressiva degenerazione (Borgarelli e Crosara, 2012; Olsen *et al.*, 2015).

Più recentemente, è stato ipotizzato che un ruolo determinante è svolto dalle Cellule Valvolari Interstiziali (VIC): esse normalmente sono quiescenti, ma, in seguito al danno endoteliale valvolare, si attivano, sintetizzando diverse sostanze (collagene, fibronectina, elastina, fattori di crescita) e rimodellando la matrice extracellulare tramite il rilascio di metalloproteinasi e i relativi inibitori. L'esito di tale rimaneggiamento è un'alterata composizione dei lembi valvolari, caratterizzata da una riduzione del collagene e da un accumulo dei proteoglicani. Inoltre le VIC si trasformano in un fenotipo muscolare liscio nel tentativo di conservare sia il tono valvolare che la funzione meccanica della mitrale. Sulla base di tali scoperte, è stato proposto un nuovo modello eziopatogenetico secondo cui, in cani geneticamente predisposti alla CVD, lo stress meccanico valvolare scatena le VIC nel produrre le metalloproteinasi 3 (MMP-3) ed il fattore di crescita trasformante beta (TGF- β -3); il conseguente aumento dei proteoglicani e la distruzione del collagene esitano nella cosiddetta degenerazione mixomatosa della valvola mitrale (**Fig. 1.2**). Questa degenerazione, inoltre, è definita sterile per l'assenza di infiltrati infiammatori (Borgarelli e Crosara, 2012), non si conoscono, infatti, correlazioni con lo sviluppo di endocardite (Abbott, 2008).

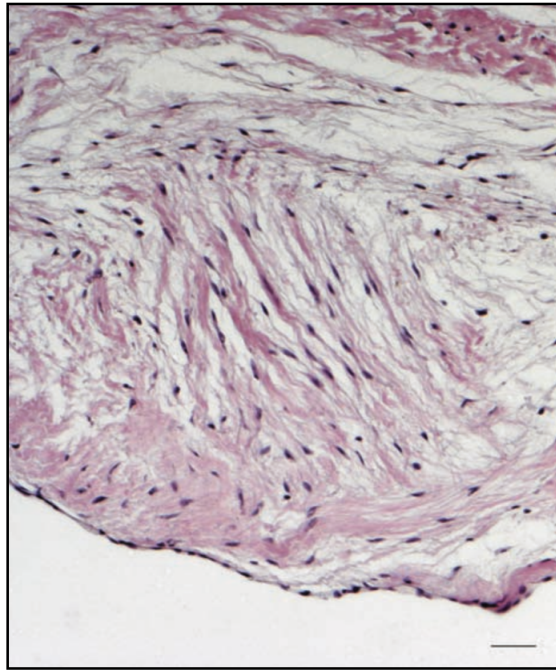


Fig. 1.2 Fotomicrografia di una sezione di lembo valvolare mitralico (MVL) con lieve degenerazione mixomatosa e disorganizzazione del collagene (Modificato da Borgarelli et al., 2011).

Infine, la CVD è considerata, da alcuni autori, parte di una disfunzione sistemica del tessuto connettivale perché è spesso concomitante a disordini quali broncomalacia e patologie dei dischi intervertebrali (Abbott, 2008).

1.3 Fisiopatologia

La degenerazione mixomatosa della valvola mitralica è caratterizzata da progressivi e fini cambiamenti strutturali dei lembi valvolari, che precedono lo sviluppo di un'insufficienza valvolare clinicamente evidente. Inizialmente si forma una piccola quantità di noduli sul margine libero dei lembi valvolari, condizione che è ben tollerata nel cane, il cui sistema cardiovascolare conserva una gittata cardiaca adeguata. Con l'avanzamento della patologia, la quantità e la dimensione dei noduli aumentano, impedendo una corretta coaptazione dei lembi e generando l'insufficienza dell'apparato valvolare (**Fig. 1.3**) (Abbott, 2008; Borgarelli e Crosara, 2012).

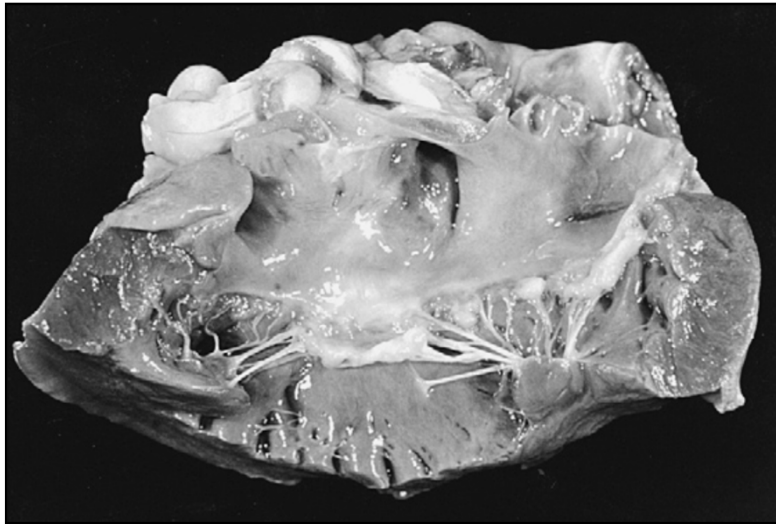


Fig. 1.3. Sezione anatomica di valvola mitralica canina, affetta da degenerazione mixomatosa: si notano i lembi valvolari ispessiti e nodulari (Modificato da Abbott, 2008).

Si assiste, quindi, alla formazione di un rigurgito nell'atrio sinistro che aumenta progressivamente con l'aggravarsi della patologia e che induce due effetti principali: l'ingrandimento della camera atriale sinistra e la riduzione della gittata cardiaca.

E' questo il momento in cui l'organismo innesca la risposta neuroendocrina compensatoria che inizialmente è adattativa, ma, se attivata in modo cronico, diventa maladattativa, costituendo la causa stessa dell'aggravamento della patologia (Ettingher *et al.*, 1998; Abbott, 2008; Borgarelli e Crosara, 2012).

La risposta neuroendocrina comprende: l'attivazione del sistema nervoso simpatico, del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone (RAAS), delle endoteline ed il rilascio di peptidi natriuretici atriali (Abbott, 2008; Borgarelli e Crosara, 2012). In primo luogo, si attiva il sistema nervoso simpatico con la produzione di catecolamine, che aumentano la frequenza e la contrattilità cardiaca (azione cronotropa ed azione inotropa positive). La prima conseguenza è il rapido ripristino della gittata cardiaca; mentre, a causa di un'attivazione adrenergica cronica, si hanno effetti non desiderabili quali l'aumento del consumo di ossigeno, la vasocostrizione periferica ed un maggiore impegno miocardico. E' stato riportato, inoltre, che i livelli di noradrenalina circolanti sembrano essere maggiori negli stadi più gravi dello scompenso cardiaco, in perfetto accordo con

l'aumento della frequenza cardiaca che si verifica in questa fase. Altri modelli sperimentali, tuttavia, hanno dimostrato la possibilità di un considerevole rilascio precoce di adrenalina, ben gestibile con i beta-bloccanti (Borgarelli e Crosara, 2012). Il secondo meccanismo compensatorio coinvolto è il RAAS il quale, secondo alcuni autori si attiva repentinamente; secondo altri, si innesca nelle fasi più tardive della patologia. A prescindere dal momento di attivazione di tale sistema, gli effetti immediati sono la ricostituzione di una gittata cardiaca ed una perfusione renale adeguate; mentre gli esiti a lungo termine sono l'aumento del pre e del post-carico ed il rimodellamento cardiaco (Borgarelli e Crosara, 2012). Com'è noto, una delle fasi di attivazione del RAAS è la trasformazione dell'Angiotensina I in Angiotensina II (A II), ad opera dell'enzima angiotensina convertente (ACE) a livello dell'endotelio polmonare e renale (**Fig. 1.4**).

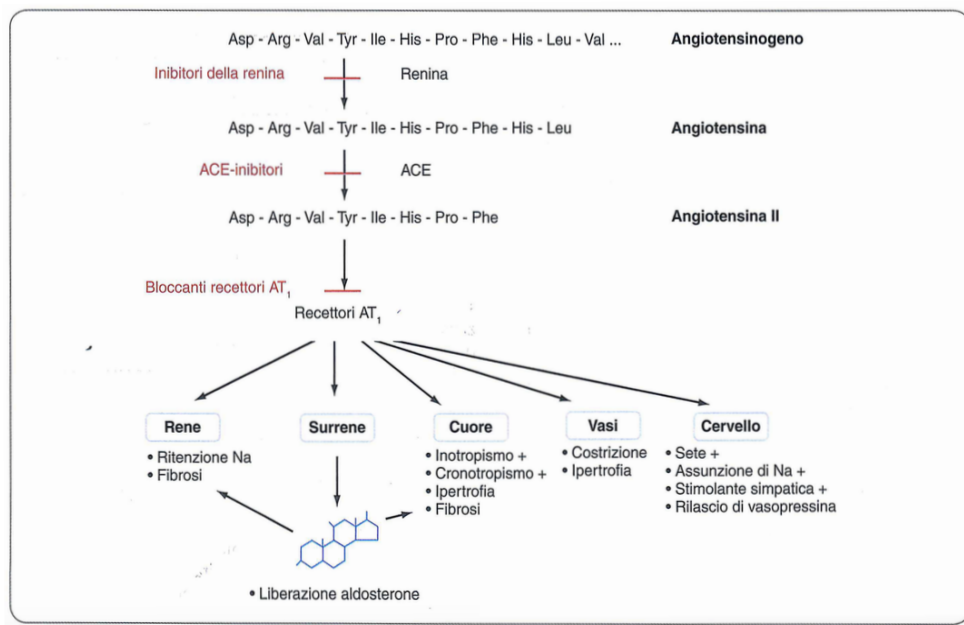


Fig. 1.4. Schema classico dell'attivazione del RAAS e degli effetti multipli dell'angiotensina II (Modificato da Borgarelli e Crosara, 2012).

Tuttavia è stato dimostrato che nel cane, a livello cardiaco, l'A II è sintetizzata maggiormente attraverso una via alternativa, ovvero la via chimasica (Borgarelli e Haggstrom, 2010; Borgarelli e Crosara, 2012). Le

chimasi sono proteasi con elevata affinità per l'angiotensina I, che si deposita all'interno dei mastociti e in alcune cellule interstiziali cardiache e, a differenza dell'enzima ACE, non hanno una distribuzione renale. Tali enzimi, infatti, sono regolati diversamente dall'enzima ACE e la loro attività sembra prevalere nelle fasi tardive dello scompenso cardiaco, correlandosi alla gravità dell'ipertrofia e fibrosi miocardica (Su *et al.*, 1999; Borgarelli *et al.*, 2012 a).

Inoltre è stata dimostrata una forte variabilità dei valori plasmatici di A II sia nei soggetti asintomatici sia nelle diverse razze canine; ad esempio in Cavalier King Charles Spaniels sani, non solo l'attività plasmatica della renina è maggiore rispetto ai soggetti sani di altre razze, ma è differente la storia naturale del sistema RAAS. Quanto descritto spiegherebbe perché la somministrazione degli ACE-inibitori non sia in grado di ritardare la sintomatologia clinica in cani affetti da insufficienza cardiaca congestizia (Atkins *et al.*, 2007).

Nel corso della patologia, il continuo *stretch* atriale sinistro, da sovraccarico volumetrico e pressorio, induce i relativi cardiomiociti a rilasciare il peptide natriuretico atriale (ANP); così come l'ipertrofia eccentrica ventricolare sinistra, causata dal sovraccarico volumetrico, determina la secrezione del peptide natriuretico cerebrale (BNP) (Borgarelli *et al.*, 2012 a). Tali peptidi, promuovono la diuresi attraverso l'aumento dell'escrezione del sodio, così da bilanciare l'azione del RAAS e del sistema nervoso simpatico. Questa compensazione è molto efficace nelle fasi precliniche della CVD, tanto che le concentrazioni sieriche di ANP e BNP, in cani asintomatici, risultano molto elevate. Negli stadi avanzati di scompenso, invece, la loro azione non riesce a contrastare i sistemi neurormonali, che quindi tendono a preponderare (Borgarelli e Crosara, 2012).

Le alterazioni emodinamiche, in corso di insufficienza mitralica, sono caratterizzate da un aumentato pre-carico ed un diminuito post-carico ventricolari. Il primo si verifica perché, con la sistole ventricolare sinistra, parte del sangue che dovrebbe immettersi nell'aorta per consentire una perfusione periferica efficiente, ritorna invece nell'atrio sinistro. Il miocardio ventricolare, quindi, nel tentativo di compensare la riduzione del volume ematico immesso in circolo e di garantire una gittata cardiaca efficiente, aumenta la sua forza di stiramento. La conseguenza è un'ipertrofia eccentrica del miocardio ventricolare sinistro che è sia caratterizzata da un rapporto tra lo spessore della parete e l'ampiezza della camera ventricolare pressoché invariato, sia associata ad un aumento della

forza di contrazione, in accordo con la legge di Frank-Starling (Abbott, 2008; Borgarelli e Crosara, 2012).

Il post-carico ventricolare, ovvero la resistenza che il miocardio ventricolare deve superare per consentire l'eiezione di sangue, risulta diminuito; ciò accade perché, nel caso specifico dell'insufficienza mitralica, il post-carico è rappresentato sia dalle resistenze periferiche del circolo sistemico, sia dalla pressione vigente nella camera atriale sinistra, laddove è diretto il rigurgito. L'atrio sinistro è una camera a bassa pressione, per cui la resistenza, che il miocardio deve superare, sarà inferiore (Borgarelli e Crosara, 2012); a conferma di ciò, è stato evidenziato che il rigurgito mitralico, è generalmente ben tollerato dal miocardio e, spesso, la contrattilità, nei cani che sviluppano insufficienza cardiaca, risulta normale o di poco diminuita (Abbott, 2008). Inoltre, studi in vivo hanno dimostrato che la funzione sistolica, in corso di CVD, diminuisce soprattutto in cani di grossa taglia e che non è direttamente proporzionale al grado di scompenso. L'ipertrofia eccentrica, il diminuito post-carico e la stimolazione nervosa simpatica, determinano, a loro volta, fenomeni di ipercinesia ventricolare. Ciò si verifica soprattutto nei cani con un rigurgito mitralico rilevante in cui tale ipercinesia complica la valutazione ecocardiografica della funzione sistolica e ne maschera la disfunzione sottostante (Borgarelli e Crosara, 2012).

La CVD può culminare, quindi, nell'insufficienza cardiaca congestizia (*Congestive Heart Failure*, CHF) di sinistra e/o di destra, che nel cane hanno due manifestazioni cliniche principali: l'edema polmonare e l'ascite, rispettivamente. L'edema polmonare è correlato all'aggravarsi e/o il persistere del rigurgito mitralico a causa del quale l'atrio sinistro si dilata progressivamente e la *compliance* polmone/cuore viene a mancare. Aumenta, quindi, la pressione nella camera atriale sinistra che impedisce alle vene polmonari di scaricarsi secondo gradiente; ne consegue una progressiva distensione e congestione delle vene polmonari stesse e la fuoriuscita di liquido nello spazio interstiziale polmonare (**Fig. 1.5**). Quando la formazione di liquido supera la soglia di drenaggio linfatico, esso si accumula negli spazi extravascolari e, progressivamente, si instaura dapprima un edema polmonare interstiziale e, negli stadi finali, un vero e proprio "allagamento" degli alveoli polmonari (edema polmonare alveolare). Laddove il peggioramento del rigurgito mitralico si verifica più repentinamente, ad esempio per un'improvvisa rottura delle corde tendinee, l'edema polmonare insorge più precocemente (Abbott, 2008; Borgarelli e Crosara, 2012).

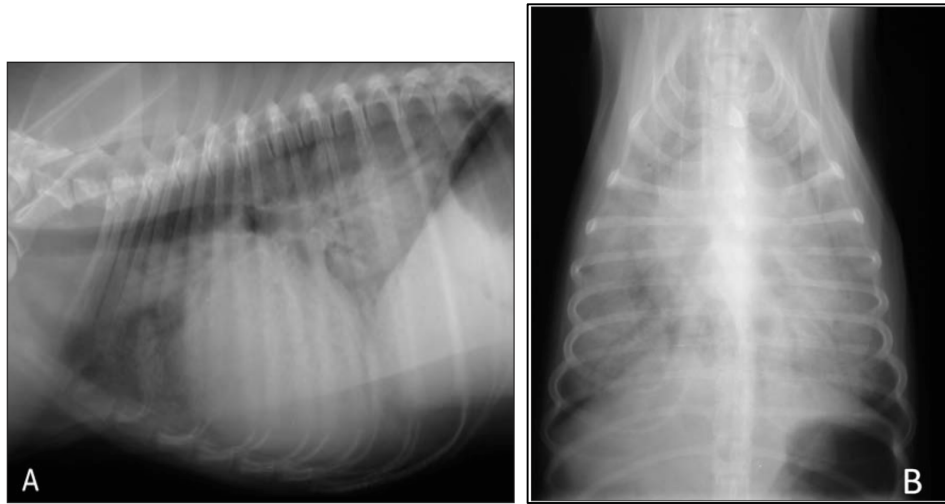


Fig. 1.5. Proiezioni radiografiche latero-laterale (A) e ventro-dorsale (B) del torace di un cane con edema polmonare cardiogeno diffuso (Modificato da Diana *et al.*, 2009).

In corso di malattia cronica mitralica è possibile lo sviluppo, concomitante o secondario, di un'insufficienza della valvola tricuspide; il rigurgito tricuspide dilata progressivamente l'atrio destro e, analogamente a quanto descritto per il settore di sinistra, viene annullato il normale gradiente pressorio vigente tra atrio destro e vene cave (caudale e craniale). L'esito è l'aumento della pressione venosa periferica che si esprime con segni di congestione, quali: epatomegalia, edemi periferici (a livello di arti, prepuzio e scroto) e, più frequentemente, ascite. Quest'ultima si manifesta, solitamente, quando la pressione venosa centrale eccede di 15 mmHg il valore soglia (< 5 mmHg) (Abbott, 2008; Borgarelli e Crosara, 2012; Olsen *et al.*, 2015).

Oltre ai meccanismi sopra descritti, lo scompenso cardiaco è associato anche ad un significativo processo infiammatorio, responsabile del peggioramento del quadro patologico e dello sviluppo della cachessia. In questo processo svolgono un ruolo centrale le citochine (Atkins *et al.*, 2009), ovvero proteine sintetizzate prevalentemente nei leucociti e nelle cellule endoteliali; esse vengono liberate in risposta all'ipossia tissutale e alla stimolazione di un fattore comune di trascrizione nucleare, il "fattore kappa b", coinvolto nella cascata infiammatoria. Attraverso un legame con specifici recettori, esse svolgono attività di tipo endocrino, paracrino ed autocrino, con differenti effetti biologici.

Nell'ambito dell'insufficienza cardiaca, le citochine più importanti sono il *Tumor Necrosis Factor-alfa* (TNF- α) ed alcune interleuchine (es. IL-6). Il TNF- α , prodotto anche dai cardiomiociti, oltre ad avere un'azione anoressizzante, e quindi cachettizzante, induce anche un disaccoppiamento tra i beta-recettori e l'adenilciclasi nel cardiomiocita. Questo comporta una mancata trasformazione dell'ATP in AMP ciclico (cAMP) ed una conseguente depressione dell'attività contrattile; l'interleuchina IL-6, invece, stimolerebbe i leucociti a produrre il TNF- α (Borgarelli *et al.*, 2012 b).

1.4 Epidemiologia, classificazione e prognosi della CVD

La malattia mitralica cronica è la cardiopatia acquisita più comune nel cane e colpisce più frequentemente i soggetti di sesso maschile e le razze di piccola taglia, quali il Cavalier King Charles Spaniel (CKCS), il Bassotto ed il Barboncino Nano. Tra i cani di grossa taglia, invece, si evidenzia il Pastore Tedesco. La prevalenza è nettamente maggiore nella popolazione geriatrica e, anche nel CKCS, è stato dimostrato che la prevalenza dei soffi cardiaci aumenta nei soggetti di età superiore ai 10 anni (Abbott, 2008; Borgarelli e Crosara, 2012). Tuttavia ciò può non essere vero in tutte le aree geografiche in cui differenti programmi di screening e linee genetiche possono incidere sulla prevalenza della patologia (Borgarelli e Crosara, 2012). A tal proposito, e al fine di migliorare la classificazione di tali soggetti, Atkins e collaboratori hanno pubblicato nel 2009 le linee guida per la diagnosi ed il trattamento della CVD, considerando sia i cani cardiopatici sia quelli a rischio di cardiopatia, sulla base dei loro sintomi e dei segni di rimodellamento cardiaco (**Tab. 1.1**) (Atkins *et al.*, 2009).

Tab. 1.1 Linee guida per la diagnosi ed il trattamento della CVD canina. ACVIM Consensus Statement (Modificato da Atkins *et al.*, 2009).

Classe A	pazienti a rischio, ma che presentano soffio mitralico
Classe B	pazienti che presentano soffio mitralico, ma che non hanno ancora sviluppato insufficienza cardiaca congestizia (CHF)
Classe B1	pazienti senza segni di ingrandimento del settore cardiaco sinistro (ecocardiografici e radiografici)
Classe B2	pazienti con segni di ingrandimento del settore cardiaco sinistro (ecocardiografici e radiografici)
Classe C	pazienti con segni di ingrandimento del settore cardiaco sinistro (ecocardiografici e radiografici) e sintomi clinici di CHF
Classe D	pazienti con scompenso cardiaco refrattario alla terapia standard

A differenza delle precedenti, tale classificazione identifica un nuovo gruppo di soggetti, ovvero i pazienti a rischio di sviluppare la malattia cronica mitralica (classe A). Essi sono le razze più predisposte (es., Cavalier King Charles Spaniel) che al momento della visita non hanno la patologia, ma, in quanto soggetti a rischio, dovrebbero essere sottoposti a programmi di screening, con l'obiettivo ultimo di ridurre la prevalenza della CVD (Borgarelli e Haggstrom, 2010).

Un punto debole, invece, è costituito dalla classe B2: essa comprende una ampia pluralità di cani, che presentano segni radiografici ed ecocardiografici di differente gravità, ma non ancora associati a sintomatologia; per cui il clinico deve interpretare accuratamente ogni singolo caso e stabilire, di conseguenza, sia la terapia più adatta sia quando iniziarla (Borgarelli e Crosara, 2012). Infine, nell'ambito delle classi C e D, gli autori precisano che i pazienti necessitano di gestioni terapeutiche diverse a seconda della gravità dello scompenso cardiaco (Atkins *et al.*, 2009).

Il decorso della CVD è generalmente lento (anni) e i soggetti con lesioni valvolari minime possono non sviluppare mai sintomi di scompenso;

diversi sono i fattori di rischio che incidono sull'evoluzione della patologia e verso i quali si deve porre maggiore attenzione. L'età del paziente, innanzitutto, è un'importante fattore prognostico: più essa è precoce al momento della diagnosi, più prelude ad una rapida progressione della malattia. Per quanto riguarda la razza, ne esistono alcune più predisposte allo sviluppo di insufficienza cardiaca indotta da CVD, come il CKCS ed il Bassotto, nelle quali la gravità del prolasso e del rigurgito mitralico, si correlano al peggioramento clinico della patologia; tuttavia, è bene evidenziare che sono possibili differenze nell'ambito della stessa razza, dovute alle diverse linee genetiche (Borgarelli e Haggstrom, 2010; Borgarelli e Crosara, 2012).

Infine, va considerato l'ingrandimento dell'atrio sinistro che è stato dimostrato essere una variabile più indipendente rispetto alle altre, ma comunque associata ad un maggiore rischio di morte (**Fig. 1.6**) (Borgarelli e Haggstrom, 2010).

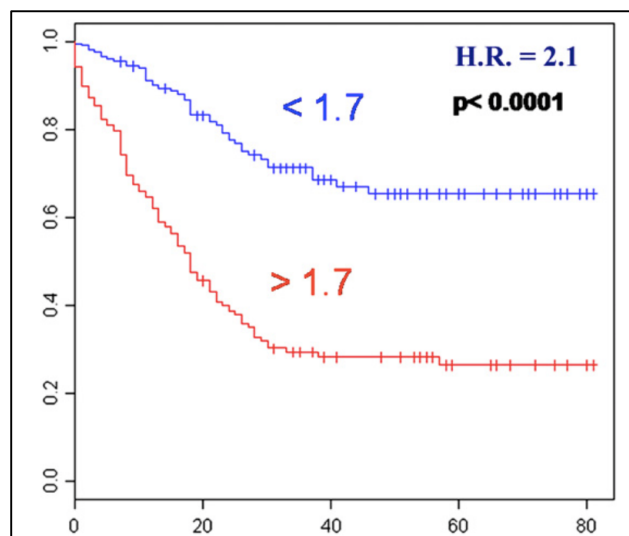


Fig. 1.6. Sopravvivenza in 558 cani con CVD con un rapporto Atrio sinistro/Aorta (As/Ao) inferiore a 1.7 e in cani con un rapporto As/Ao superiore di 1.7. I cani senza ingrandimento atriale sinistro avevano un aumento significativo del tempo di sopravvivenza (Modificato da Borgarelli e Haggstrom, 2010)

1.5 Diagnosi e sintomatologia della CVD

1.5.1 Esame clinico

Il sospetto clinico di malattia mitralica cronica nasce generalmente dall'auscultazione di un soffio cardiaco di morfologia a plateau sul focolaio mitralico (Borgarelli e Crosara, 2012); tuttavia, i quadri auscultatori sono molto variabili in funzione della gravità della CVD. Infatti, nelle forme iniziali o lievi della malattia, il soffio può non essere presente, ma si ausculta solo il cosiddetto 'click mesosistolico' generato dalla tensione delle corde tendinee e dei lembi mitralici ridondanti; nell'uomo è un suono indicativo di prollasso mitralico e lo si apprezza più marcatamente in condizioni di tachicardia spontanea o indotta. Negli stadi più avanzati di CVD, invece, è possibile riscontrare un soffio più intenso, con possibile presenza di fremito ed un'irradiazione verso la base cardiaca e a destra; ciò si verifica a causa dell'ingrandimento atrioventricolare sinistro e di una possibile concomitante insufficienza tricuspideale. Inoltre, nei cani scompensati, in particolare in quelli di grossa taglia, la presenza del soffio può essere occultata dalle aritmie sopraggiunte (es. fibrillazione atriale). E' importante rimarcare che l'identificazione del soffio e la sua intensità non sono sempre accompagnati da uno stato clinico della stessa gravità (Borgarelli e Haggstrom, 2010; Borgarelli e Crosara, 2012).

1.5.2 Rilievi elettrocardiografici

L'elettrocardiogramma, generalmente, ha un uso limitato nella diagnosi di CVD perché è un indicatore poco sensibile di ingrandimento cardiaco (nonché di insufficienza cardiaca e/o edema polmonare), tuttavia è possibile riscontrare rilievi utili nell'iter diagnostico-strumentale del nostro paziente. Nelle fasi iniziali della malattia cronica mitralica, l'aritmia sinusale (o respiratoria) è conservata, così come l'Asse Elettrico Medio risulta nei range di normalità, entro i quali può rimanervi anche per tutta la durata della patologia. Con il progredire della CVD, invece, possiamo osservare un'onda P di maggiore durata ($> 0,04$ sec) a causa di un significativo ingrandimento atriale sinistro (**Fig. 1.7**); analogamente, il complesso QRS risulta prolungato e l'onda R aumentata in voltaggio, in seguito ad un importante ingrandimento ventricolare sinistro. Laddove si è sviluppato un'insufficienza cardiaca, i reperti elettrocardiografici più comuni sono una perdita dell'aritmia respiratoria, che coincide

tendenzialmente con l'instaurarsi di una tachicardia sinusale; nonché differenti aritmie quali complessi prematuri atriali, flutter e/o fibrillazione atriale (Olsen *et al.*, 2015).

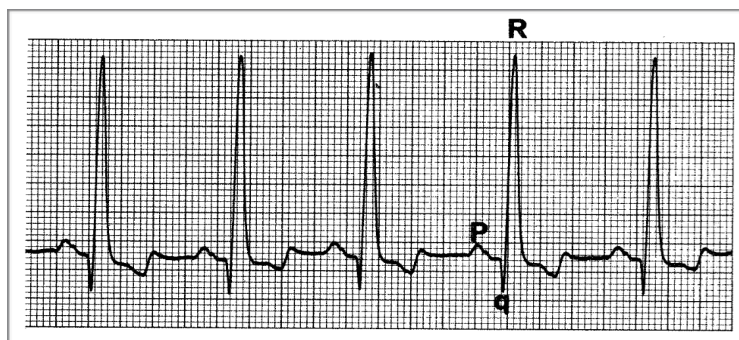


Fig. 1.7. Ingrandimento atriale sinistro in un cane con CVD. Le onde P sono ampie (0,06 sec) (Modificato da Tilley, 1985).

1.5.3 Ecocardiografia

L'ecocardiografia è il gold standard nella diagnosi di CVD e consente di confermarne il sospetto clinico, stabilirne la gravità, escludere la presenza di patologie concomitanti ed eventuali complicanze (Borgarelli e Crosara, 2012). All'esame ecocardiografico, i lembi valvolari mitralici mostrano tipicamente un ispessimento più o meno associato al prollasso che rappresenta un dislocamento superiore e posteriore, anormale, dei lembi mitralici dal ventricolo sinistro verso l'atrio sinistro, durante la sistole (Borgarelli e Haggstrom, 2010). Esso è indice generale di gravità dell'insufficienza mitralica, ma non è necessariamente collegato all'avanzamento degli stadi della CVD; infatti alcuni soggetti sviluppano un prollasso significativo (accompagnato dalla rottura di una o entrambe le corde tendinee) aggravandosi clinicamente. Invece, altri cani convivono con un prollasso poco rilevante per tutta la durata della patologia, senza un effettivo peggioramento clinico.

Attualmente si consiglia di confermare la presenza del prollasso mitralico in almeno due proiezioni ecocardiografiche, ovvero la proiezione parasternale destra quattro camere e la proiezione parasternale destra asse lungo (gold standard nell'uomo), che include anche il tratto di efflusso ventricolare sinistro. Questo perché, a causa della morfologia variabile

dell'anulus mitralico (ad es. morfologia a sella nell'uomo, confermata anche nel cane), la classica proiezione parasternale destra quattro camere, può condurre ad una significativa sovrastima della prevalenza del prolasso (Borgarelli e Haggstrom, 2010; Borgarelli e Crosara, 2012).

Un altro importante rilievo è l'ingrandimento atriale sinistro che viene valutato attraverso il rapporto dei diametri dell'atrio sinistro e dell'aorta ed è strettamente correlato all'aumento della progressione della patologia e/o di rischio di mortalità (Borgarelli *et al.*, 2012 a). Ad esempio, un rapporto superiore a 1,4 in cani asintomatici è associato ad un aumento di 2,6 volte del rischio di morte per cause cardiache. In medicina veterinaria, un metodo molto usato è la stima del rapporto tra l'area eco-color-Doppler del rigurgito mitralico e l'area dell'atrio sinistro: se tale rapporto è inferiore al 30% l'insufficienza è considerata lieve, mentre se superiore al 50% l'insufficienza sarà grave (**Fig. 1.8**) (Borgarelli e Crosara, 2012).

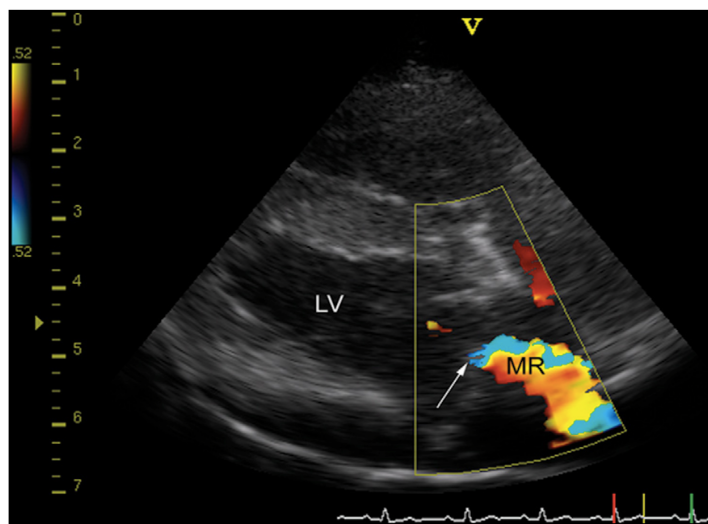


Fig.1.8. Scansione parasternale destra in asse lungo in un CKCS di 5 anni con CVD. La mappatura del color Doppler dimostra la presenza del rigurgito mitralico (MR); il mosaico di colori occupa meno del 50% dell'area dell'atrio sinistro ed il jet è relativamente ristretto alla sua origine (Modificato da Abbott, 2008).

Le funzioni sistolica e diastolica richiedono un'attenta interpretazione, sia in virtù delle particolari condizioni di pre e post carico presenti nella CVD, sia considerando l'assenza di *cut off* precisi per la specie canina. Una frazione di accorciamento lievemente aumentata o nei limiti della norma,

così come un diametro ventricolare telesistolico normalizzato aumentato, devono, quindi, essere considerati indicativi di disfunzione sistolica. Anche in questo caso i rilievi ecografici non sono sempre direttamente proporzionali alla gravità del quadro clinico, infatti un cane scompensato (stadio C) può avere una funzione sistolica conservata.

Per la funzione diastolica, è necessario fare un attento studio del flusso transmitralico rappresentato dal rapporto delle velocità di picco delle onde E ed A. Infatti, l'aumento dell'onda E, e quindi del rapporto E/A, possono significare sia un pattern restrittivo del riempimento ventricolare, tipico degli stadi avanzati della patologia; sia il sovraccarico del volume atriale, causato da un consistente rigurgito mitralico, in corso di una CVD non complicata. Quindi, per una più corretta stadiazione, occorre valutare anche altri elementi quali il flusso polmonare e il doppler tissutale del movimento dell'anulus mitralico (Borgarelli e Crosara, 2012).

Infine, le linee guida ACVIM raccomandano di eseguire sempre un esame radiografico del torace al fine sia di avere una *baseline* nel paziente asintomatico o sospetto, sia di monitorare nel tempo le conseguenze emodinamiche del soffio nel cane malato. Uno studio recente, eseguito su 24 Cavalier King Charles Spaniels suggerisce, infatti, che un cambiamento delle dimensioni cardiache radiografiche, nonché ecocardiografiche, rilevato tra due *time points* diversi, può avere un valore predittivo più potente rispetto al valore assoluto di una sola misurazione (Atkins *et al.*, 2009; Borgarelli e Haggstrom, 2010; Lord *et al.*, 2010). Nello stesso studio, è stato visto che le dimensioni cardiache radiografiche ed ecocardiografiche (*Vertebral Heart Score* – VHS, diametri telediastolico e telesistolico del ventricolo sinistro) aumentano più rapidamente solo nell'anno precedente allo sviluppo dell'insufficienza cardiaca (Lord *et al.*, 2010). L'indagine radiografica consente di rilevare gli effetti emodinamici della malattia cronica mitralica (ingrandimenti atriali, edema polmonare) nonché di individuare possibili patologie respiratorie contemporanee (affezioni tracheobronchiali, polmoniti o neoplasie polmonari). Queste ultime possono costituire sia la causa primaria della tosse (o dispnea) in cani affetti da CVD, sia un fattore aggravante la sintomatologia respiratoria di origine cardiaca (Borgarelli e Haggstrom, 2010; Borgarelli e Crosara, 2012).

L'eziologia della tosse, nell'ambito della CVD (in particolare nei cani di piccola taglia), sembra essere multifattoriale ed il tempo d'insorgenza è variabile (Abbott, 2008). Può essere causata dalla compressione dei bronchi principali, esercitata dall'atrio sinistro aumentato di volume; in

molti casi, ciò si verifica solo in presenza di bronchi affetti da malacia e quindi facilmente comprimibili. Infatti, come accennato all'inizio, la CVD è spesso concomitante a condizioni di broncomalacia (nonché di collasso tracheale) e, quindi, la tosse può insorgere anche mesi prima dello scompenso cardiaco.

Un'altra componente eziologica è costituita dalla stimolazione dei recettori juxtapolmonari (J), associati ai capillari polmonari e sensibili all'ipertensione venosa polmonare; in tal caso, la tosse è espressione dell'edema polmonare in corso di scompenso cardiaco (Abbott, 2008). Secondo alcuni autori, quanto descritto può non essere vero nei cani di grossa taglia che, generalmente, non mostrano tosse in fase di scompenso cardiaco (D'agnolo, 2012). Saper distinguere la tosse causata dal rigurgito mitralico da quella, ben più grave, provocata dall'insufficienza congestizia diventa fondamentale per la prognosi e la terapia: la prima è tendenzialmente secca e sonora (definita *honking*, ovvero suono di clacson o verso d'anatra) e costituisce uno dei primi segni di CVD percepiti dal proprietario; la tosse da scompenso cardiaco, invece, è di tipo misto-produttivo (accompagnata da espettorazioni rosate) ed ha un suono più tenue ed ovattato (Abbott, 2008; D'agnolo, 2012).

1.6 Terapia

Una corretta terapia per la malattia cronica mitralica pone il clinico, inizialmente, davanti a due problematiche: l'individuazione del paziente a rischio di scompenso cardiaco e la scelta del momento in cui iniziare la somministrazione dei farmaci. Diventa, quindi, indispensabile inquadrare il cane nella classificazione ACVIM, attuare un iter clinico-strumentale completo e, infine, adattare la terapia al singolo paziente (Borgarelli e Crosara, 2012).

1.6.1 Cane asintomatico (Classe B1 e B2 ACVIM)

Lo stadio asintomatico è considerato una condizione relativamente benigna, simile a quanto riportato in umana, anche di lunga durata (Borgarelli e Haggstrom, 2010); tuttavia, la classe B2 include un gruppo di pazienti molto eterogeneo, per i quali non risulta semplice stabilire quale terapia e quando iniziarla.

Numerosi studi sull'efficacia degli ACE-inibitori, nel rallentare la progressione della CVD, forniscono risultati contrastanti. Alcuni autori

hanno affermato che la somministrazione di enalapril, al dosaggio di 0,25-0,5 mg/kg, in cani CKCS asintomatici, non ritardava la progressione dello scompenso cardiaco (Kvart *et al.*, 2002).

Altri autori, invece, seppur confermando lo stesso risultato sostanziale, hanno evidenziato anche la possibilità di un modesto effetto positivo dell'enalapril: sembra infatti che, considerando *end point* combinati, quali la mortalità per qualsiasi causa ed il numero dei giorni in cui i cani siano rimasti asintomatici (*Congestive Heart Failure-free*), l'azione degli ACE-inibitori abbia migliorato i tempi di sopravvivenza in soggetti con malattia pre-clinica (Atkins *et al.*, 2007).

Anche Pouchelon, in uno studio del 2008, ha evidenziato un modesto effetto positivo del benazepril in un gruppo di cani asintomatici; tuttavia tali risultati non sono stati confermati in una sotto analisi eseguita per le razze CKCS e King Charles Spaniel, con rigurgito mitralico da moderato a severo (Pouchelon *et al.*, 2008).

Il parere generale, nonostante tali conclusioni divergenti, è quello che la terapia precoce con ACE-inibitori non rallenta l'avanzamento dell'insufficienza mitralica e che, poiché non è chiaro quando ed in quale misura il RAAS si attivi, non è giustificato l'utilizzo di tali farmaci in tutti i cani asintomatici affetti da CVD (Borgarelli e Crosara, 2012).

Più recentemente, è stato condotto uno studio prospettico, multicentrico e randomizzato, che ha dimostrato l'efficacia dell'utilizzo del pimobendan nei soggetti in classe B2 (Boswood *et al.*, 2016). Il pimobendan è un derivato benzimidazolico inibitore della fosfodiesterasi III (PDE III) ed appartiene alla famiglia degli "inodilatatori": il suo meccanismo di azione, infatti, include sia un'azione inotropica positiva che una vasodilatazione (venosa e arteriolare) (Borgarelli *et al.*, 2012 b). La conclusione degli autori è che la somministrazione cronica di pimobendan per via orale, in cani asintomatici con evidenze radiografiche ed ecocardiografiche di cardiomegalia, induce un prolungamento della fase preclinica della malattia ed un significativo ritardo nell'*onset* dell'insufficienza cardiaca; inoltre tale principio attivo si è rivelato sicuro e ben tollerato nel cane (Boswood *et al.*, 2016).

1.6.2 Cane sintomatico (classe C e D ACVIM)

I numerosi studi pubblicati dimostrano che la terapia in cani con segni clinici di insufficienza cardiaca comprende la combinazione di furosemide, ACE-inibitori, pimobendan e spironolattone. Non esiste un'associazione migliore, ma la scelta più adatta tiene conto sia del singolo paziente che può avere diversi gradi di scompenso cardiaco e/o patologie concomitanti, sia della *compliance* del proprietario (Borgarelli e Crosara, 2012).

La furosemide è il diuretico d'ansa più utilizzato e, oltre ad avere un potente effetto diuretico (attraverso un'escrezione di sodio del 15-25% nella porzione spessa dell'ansa di Henle e nel tubulo distale), ha anche un'azione venodilatatrice (subito dopo la somministrazione endovenosa) di cui il meccanismo non è stato del tutto chiarito. E' un farmaco molto maneggevole per l'ampio range di dosaggio e per la possibilità di somministrarlo per via orale, sottocutanea ed endovenosa. Quest'ultima via è fondamentale nei soggetti con CHF refrattaria, in cui la congestione venosa presente anche a livello gastroenterico, riduce l'assorbimento per via orale della furosemide e di altri principi attivi. La furosemide, quindi, riduce il precarico e, indirettamente, esercita un'azione positiva anche sulla funzione sistolica del cuore; infatti i ventricoli, con un precarico diminuito, riducono progressivamente la loro sfericità e migliorano la loro contrattilità (Borgarelli *et al.*, 2012 b).

Per quanto riguarda gli ACE-inibitori, negli studi COVE, IMPROVE, LIVE e BENCH è stato evidenziato che l'aggiunta di enalapril o benazepril, nella terapia classica costituita dall'associazione di furosemide e/o digossina, migliora la qualità della vita e aumenta i tempi di sopravvivenza dei cani sintomatici (Woodfield *et al.*, 1995 a; Woodfield *et al.*, 1995 b; Ettingher *et al.*, 1998; Pouchelon *et al.*, 1999). Inoltre, tali studi dimostrano che gli ACE-inibitori dovrebbero essere usati ai massimi dosaggi definiti efficaci, e somministrati due volte al giorno; infatti è stato descritto che a 24 ore dall'assunzione del farmaco, l'inibizione dell'attività dell'enzima ACE è relativamente modesta (Borgarelli e Crosara, 2012).

Il pimobendan, invece, è stato indagato nello studio QUEST, in cui è stato dimostrata una maggiore efficacia dell'associazione del pimobendan con la terapia convenzionale, rispetto alla combinazione del benazepril e la terapia classica; infatti sono risultati prolungati i tempi sopravvivenza nei soggetti affetti da insufficienza cardiaca congestizia causata da CVD (Haggstrom *et al.*, 2008). Attualmente i diuretici d'ansa, il pimobendan e gli ace-inibitori vengono utilizzati in associazione nel trattamento dei

pazienti in classe C, con comprovati effetti benefici per il paziente (Atkins *et al.*, 2009).

Lo spironolattone, invece, appartiene alla classe dei diuretici risparmiatori di potassio che si caratterizzano per un blando effetto diuretico (escrezione di sodio del 2%); lo spironolattone, infatti, viene impiegato per la sua azione contrastante il sistema RAAS che esplica attraverso un legame competitivo con i recettori per l'aldosterone a livello del tubulo contorto distale (Borgarelli *et al.*, 2012 b). Alcuni autori hanno dimostrato come tale principio attivo sia efficace nelle fasi precoci della CVD e, in particolare, se associato alla terapia standard (furosemide, ACE-inibitori con o senza digossina), riduce il rischio di mortalità, di eutanasia e di peggioramento clinico del 55% (Bernay *et al.*, 2010). Più recentemente è stato dimostrato anche che l'utilizzo dello spironolattone nei cani con insufficienza cardiaca congestizia, in aggiunta alla terapia convenzionale, non aumenta il rischio né di eventi avversi (sistemici, respiratori e gastroenterici) né di patologie renali, iperkaliemia o iperazotemia, in confronto ai soggetti trattati con placebo (Lefebvre *et al.*, 2013).

Altri farmaci da considerare nella gestione terapeutica di questi pazienti sono: la digossina, l'amlodipina, i diuretici tiazidici e la torasemide. La prima, appartenente alla categoria delle glicosidi della digitale (*Digitalis purpurea*), viene usata per le sue proprietà inotrope positive e cronotrope negative (ad es., in presenza di fibrillazione atriale); l'amlodipina, invece, rientra nel trattamento dell'ipertensione sistemica e la gestione cronica di un'insufficienza cardiaca refrattaria alla terapia standard (Borgarelli e Crosara, 2012).

La torasemide, infine, è un diuretico d'ansa di più recente utilizzo nel cane; essa, a differenza della furosemide, è dotata di maggiori biodisponibilità, emivita e durata d'azione, ma soprattutto, è meno soggetta alla diuretico-resistenza. Quest'ultimo fenomeno si sviluppa in seguito a numerosi meccanismi che si verificano in corso di CHF, quali l'ipertrofia dei nefroni, la riduzione della perfusione renale, squilibri elettrolitici e attivazione del RAAS; tali fenomeni rendono il paziente refrattario al trattamento cronico con il diuretico (Oyama *et al.*, 2011). In questi casi, l'impiego di un diuretico differente, come la torasemide, può essere una scelta più efficace (Borgarelli *et al.*, 2012 b); inoltre è stato anche dimostrato che, in cani sani, la torasemide è ben tollerata e che le relative dosi da utilizzare, per raggiungere una diuresi efficace, sono un decimo della dose di furosemide (Peddle *et al.*, 2012).

1.7 Complicanze

1.7.1 Aritmie

Le aritmie più frequenti, in cani affetti da CVD, sono di tipo sopraventricolare e/o ventricolare. Tra le diverse cause ipotizzate per le aritmie ventricolari, vi è, innanzitutto, lo stress intenso a cui sono sottoposti i lembi valvolari degenerati ed in particolare la loro componente nervosa. Altri fattori scatenanti possono essere: il rimodellamento ventricolare e atriale, lo stretch delle corde tendinee sui muscoli papillari e le ischemie causate dall'aterosclerosi dei vasi coronarici minori (Borgarelli e Crosara, 2012). Le aritmie sopraventricolari, invece, sono indotte principalmente dalla dilatazione e rimodellamento atriale sinistro. Esse sono quelle più comuni nei cani affetti da malattia cronica mitralica e sono rappresentate da: complessi atriali prematuri, flutter e fibrillazione atriale (FA) (Borgarelli e Crosara, 2012). I cani di grossa taglia sono più suscettibili di sviluppare tali aritmie, a causa del fatto che raggiungono più precocemente la soglia critica della massa atriale, oltre la quale si instaurano le alterazioni elettriche.

I complessi atriali prematuri o battiti ectopici atriali prematuri, sono depolarizzazioni spontanee che originano da strutture diverse dal nodo del seno (miocardio atriale, nodo atrio-ventricolare, seno coronario, etc.); si definiscono prematuri quando tale depolarizzazione interviene prima della normale depolarizzazione sinusale, desunta dall'analisi degli intervalli P-P precedenti (Santilli e Perego, 2014). Tali complessi possono essere isolati o in coppia o organizzati in bigeminismo atriale e, generalmente, non provocano alterazioni emodinamiche significative (Borgarelli e Crosara, 2012).

Il flutter e/o la fibrillazione atriale (FA), costituiscono due aritmie differenti, ma entrambe causate, come già accennato, dalla dilatazione atriale presente in corso di CVD. Il primo è una tachicardia atriale con ritmo organizzato e con frequenza media, nel cane, maggiore di 300 bpm (**Fig. 1.9**). Esso può degenerare in fibrillazione atriale, che invece rappresenta un'attivazione atriale non coordinata, con conseguente deterioramento della funzione meccanica atriale e si manifesta con l'assenza costante dell'onda P; la FA può anche riorganizzarsi in flutter atriale (Santilli e Perego, 2014).



Fig.1.9. Flutter atriale in un cane (Modificato da Côté, 2010).

Generalmente, entrambe le aritmie sono associate ad un'elevata frequenza cardiaca, rendendosi responsabili di un importante peggioramento clinico del paziente; infatti, l'elevata frequenza cardiaca non consente all'atrio sinistro di svuotarsi completamente nel ventricolo sinistro in fase diastolica, con conseguente sovraccarico pressorio e possibile sviluppo di edema polmonare. L'obiettivo della terapia, in questi casi, è quello di controllare la frequenza cardiaca ed il trattamento migliore, suggerito nel cane, è l'associazione di digossina e del calcio-antagonista diltiazem (Borgarelli e Crosara, 2012).

1.7.2 Rottura delle corde tendinee (Chordae Tendineae Rupture)

Quando il processo degenerativo coinvolge anche le corde tendinee, esse vanno incontro a rottura; in particolare, quella delle corde tendinee maggiori o primarie provoca un aggravamento acuto dello stato clinico, dovuto al repentino aumento della quota di rigurgito nell'atrio sinistro. Il sospetto di rottura delle corde tendinee deve nascere ogni qual volta un cane cardiopatico, stabile, va incontro a scompenso cardiaco improvviso. All'esame clinico, solitamente, è possibile udire un soffio sistolico di intensità diminuita, a causa della maggiore area di comunicazione tra le camere atrio-ventricolari sinistre e della relativa diminuzione del gradiente pressorio. All'esame ecocardiografico si può rilevare un movimento sistolico di un lembo mitralico fluttuante, nell'atrio sinistro, nonché un jet eccentrico di insufficienza mitralica; tuttavia quest'ultimo aspetto è più caratteristico nell'uomo. Infatti, l'assenza di precisi criteri diagnostici ecocardiografici, per la specie canina, causa spesso difficoltà nella

diagnosi differenziale, e nella prognosi, tra una grave forma di prolasso e la rottura delle corde tendinee vera e propria (Borgarelli e Crosara, 2012). Secondo Serres e collaboratori, la prognosi della CRT si basa principalmente sulla combinazione di segni clinici e fattori biochimici, ed il tempo di sopravvivenza nei soggetti affetti è maggiore di quanto supposto in passato (Serres *et al.*, 2007). In caso di CRT conclamata, la terapia prevede l'ospedalizzazione immediata del soggetto, con somministrazione rapida di ossigeno, di furosemide e di dobutamina per via endovenosa.

La dobutamina, come è noto, è una catecolamina sintetica con azione inotropica positiva e senza effetti ipertensivi; grazie al suo effetto irrilevante sulle resistenze periferiche e alle scarse conseguenze aritmogene, è preferita di gran lunga alla dopamina. Nei casi più gravi, infine, si può utilizzare la nitroprusside, un vasodilatatore misto, che agisce sia a livello arteriolare che venoso, riducendo il pre ed il post-carico (Borgarelli *et al.*, 2012 b).

1.7.3 Ipertensione polmonare

Alla malattia cronica mitralica si può associare anche uno stato di ipertensione polmonare, definita post-capillare o di tipo II, secondo la nuova classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). Il meccanismo fisiopatologico è complesso e si compone essenzialmente di due fasi, di cui una reversibile ed un'altra irreversibile. Nella prima, le alte pressioni vigenti nell'atrio sinistro inducono un aumento pressorio delle vene polmonari, perché esse non possono scaricarsi adeguatamente; ne consegue un aumento della pressione capillare, a monte, che provoca un danno della membrana alveolo-capillare. La matrice extracellulare intorno a tale membrana si ispessisce progressivamente (fase potenzialmente reversibile) e, se l'aumento pressorio atriale diventa cronico, il processo culmina nella muscolarizzazione delle arteriole polmonari. Quest'ultimo stadio, definito irreversibile, è determinato dall'attivazione combinata di molte sostanze (elastasi, endoteline, tenascina C, etc.) e comporta un stato di ipertensione polmonare permanente (Borgarelli e Crosara, 2012).

Nel cane affetto da CVD, questa complicanza ha una prevalenza di circa il 21% e la diagnosi clinica si basa sul riscontro di segni di scompenso cardiaco destro (ascite) e segni della diminuzione della gittata cardiaca, come la sincope (Borgarelli e Crosara, 2012). Quest'ultima può insorgere durante uno esercizio fisico, perché la ridotta gittata cardiaca non soddisfa

le richieste circolatorie durante lo sforzo (Santilli e Perego, 2012); oppure è causata dalle aritmie, sopracitate, a cui predispone la dilatazione miocardica in corso di CVD (Abbott, 2008). Tuttavia, nel cane e nel gatto, le sincope aritmiche sono indotte primariamente da bradiaritmie (Santilli e Perego, 2012).

Ecocardiograficamente è possibile riscontrare diversi criteri diagnostici di ipertensione polmonare, come ad esempio: ipertrofia ventricolare destra con dilatazione dell'arteria polmonare principale, lieve versamento pericardico, insufficienza polmonare (con una velocità di picco superiore a 2 m/sec) e/o insufficienza tricuspide (con velocità di picco superiore a 2,8 m/sec). Alcuni autori riportano un *cut-off* per il gradiente pressorio atrio-ventricolare destro di 48 mmHg, al di sopra del quale si può stabilire, con elevata sensibilità e specificità (80%), la presenza di ipertensione polmonare; inoltre, al di sopra di tale limite, lo stato ipertensivo non sembra migliorare anche sotto una terapia mirata (Chiavegato *et al.*, 2009). Tutti questi elementi, se associati tra loro, consentono una diagnosi ed una prognosi dello stato ipertensivo (Borgarelli e Crosara, 2012).

Nei soggetti con ipertensione polmonare acuta, ma tuttavia ancora reversibile, la terapia prevede una somministrazione aggressiva di diuretici e vasodilatatori, per ridurre le pressioni atriali sinistre. Nei pazienti affetti da un'ipertensione cronica irreversibile, invece, il trattamento ha lo scopo di tenere sotto controllo la pressione polmonare. Il farmaco di scelta, per tale scopo, è il sildenafil: un inibitore selettivo della fosfodiesterasi V che, con la sua spiccata azione vasodilatatrice, diminuisce le pressioni polmonari (quindi il post carico ventricolare destro) e, di conseguenza, aumenta gli scambi gassosi e migliora la contrattilità ventricolare destra. Tuttavia, va sottolineato che la maggior parte dei risultati positivi sull'utilizzo di questo farmaco derivano da studi pilota nell'uomo e nel cane, mentre in campo clinico veterinario, essi sono variabili e incostanti (Borgarelli e Crosara, 2012). Inoltre, in uno studio del 2007, è stato riportato che i segni di miglioramento nel cane in terapia con sildenafil sono stati prevalentemente clinici, ma, di fatto, il farmaco non ha ridotto in modo significativo il livello di ipertensione polmonare (Kellum *et al.*, 2007).

1.7.4 Rottura dell'atrio sinistro

L'atrio sinistro, sottoposto ad un progressivo ingrandimento ed un persistente impatto ad alta velocità del jet rigurgitante sulla parete (*jet impact lesions*), può subire fessurazioni multiple endomiocardiche e/o endocardiche; queste possono essere riparate oppure esitare in una perforazione parietale, con conseguente sviluppo di anomalie acquisite del setto interatriale o versamento pericardico (Borgarelli e Crosara, 2012). Il versamento pericardico (emopericardio) (**Figg. 1.10 e 1.11**) è sicuramente una delle conseguenze più gravi e, se associato a segni di tamponamento cardiaco, richiede una pericardiocentesi d'urgenza; la prognosi, in generale, è riservata.

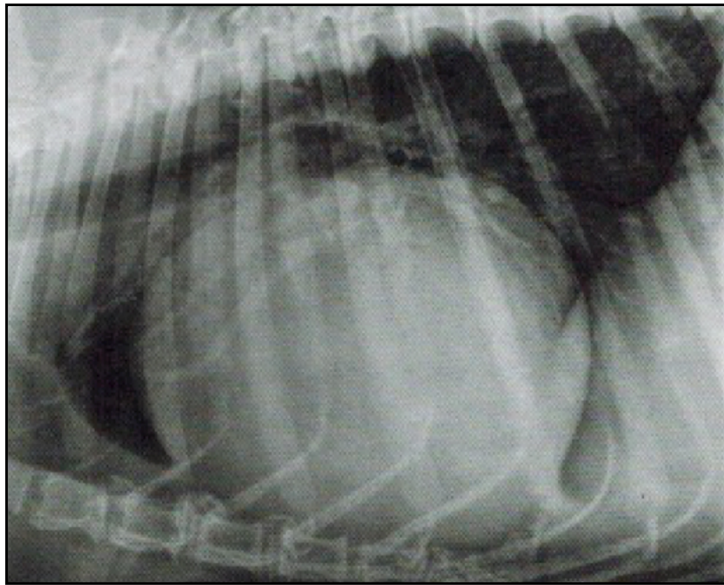


Fig. 1.10. Proiezione radiografica laterale destra di versamento pericardico acuto in un cane: si nota la maggiore definizione della silhouette cardiaca, dovuta al versamento, e l'ipoperfusione dei campi polmonari (Modificato da Santilli e Perego, 2012).

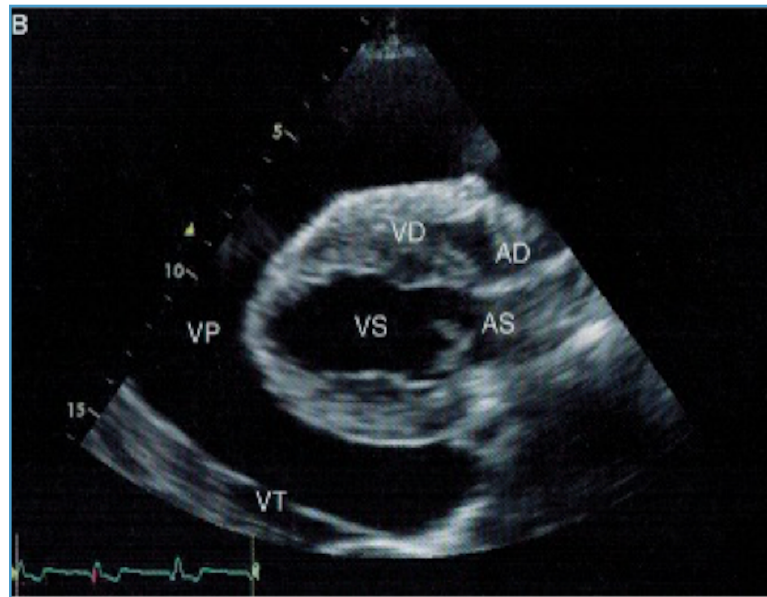


Figura 1.11. Proiezione ecocardiografica parasternale destra asse lungo: è presente versamento pericardico cronico caratterizzato da una maggiore quantità di liquido e dal collasso della parete atriale destra (Modificato da Santilli et al., 2012).

- Abbott JA. Acquired valvular disease. In: Tilley LP, Smith JR, Francis WK, Oyama MA, Sleeper Meg M. Manual of canine and feline cardiology. 4th ed. Saunders Elsevier 2008; pag. 110-131.
- Atkins CE, Keene BW, Brown WA *et al.* Results of the veterinary enalapril trial to prove reduction in onset of heart failure in dogs chronically treated with enalapril alone for compensated, naturally occurring mitral valve insufficiency. Journal of the American Veterinary Medical Association 2007; 231:1061-9.
- Atkins CE, Bonagura J, Ettinger S, Fox P, Gordon S, Haggstrom J, Hamlin R, Keene (Chair), Luis-Fuentes V, Stepien R. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. Journal of the American Veterinary Medical Association 2009; 6: 1142-50.
- Bernay F, Bland JM, Haggstrom J, *et al.* Efficacy of spironolactone on survival in dogs with naturally occurring mitral regurgitation caused by myxomatous mitral valve disease. Journal of Veterinary Internal Medicine 2010; 24:331-341.
- Borgarelli M e Haggstrom J. Canine Degenerative Myxomatous Mitral Valve Disease. Natural History, Clinical Presentation and Therapy. Veterinary Clinic North American Small Animal Practice 2010; 40:651-63.
- Borgarelli M, Tursi M, La Rosa G, Savarino P, Galloni M. Anatomic, histologic, and two-dimensional– echocardiographic evaluation of mitral valve anatomy in dogs. American Journal Veterinary Research 2011; 72: 9.
- Borgarelli M e Crosara S. Malattia cronica mitralica. In: Santilli RA, Bussadori C, Borgarelli M. Manuale di cardiologia del cane e del gatto. 1st ed. Elsevier 2012; pag. 153-164.
- Borgarelli M, Crosara S, Lamb K, Savarino P, La Rosa G, Tarducci A, and Haggstrom J. Survival Characteristics and Prognostic Variables of Dogs with Preclinical Chronic Degenerative Mitral Valve Disease Attributable to Myxomatous Degeneration. Journal of Veterinary Internal Medicine 2012 a; 26: 69–75.
- Borgarelli M, Chiavegato D, Crosara S. Insufficienza cardiaca: fisiopatologia e principi di terapia. In: Santilli RA, Bussadori C, Borgarelli M. Manuale di cardiologia del cane e del gatto. 1th ed. Elsevier 2012 b; pag. 125-143.
- Boswood A, Haggstrom J, Gordon SG, Wess G, Stepien RL *et al.* Effect of Pimobendan in Dogs with Preclinical Myxomatous Mitral Valve

- Disease and Cardiomegaly: The EPIC Study-A Randomized Clinical Trial. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2016; 30: 1765–1779.
- Chiavegato D, Borgarelli M, D'agnolo G, Santilli RA. Pulmonary hypertension in dogs with mitral regurgitation attributable to myxomatous valve disease. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 2009; 50 (3): 253–258.
- Cotè E. Elettrocardiografia e aritmie cardiache. In: Ettingher SJ, Feldman EC, editors. *Trattato di Clinica Medica Veterinaria* 7th ed. St. Louis Elsevier Saunders 2010, pag. 1176.
- D'Agnolo G. Esame clinico del paziente cardiopatico. In: Santilli RA, Bussadori C, Borgarelli M. *Manuale di cardiologia del cane e del gatto*. 1th ed. Elsevier 2012; Pag: 31, 32.
- Diana A, Guglielmini C, Pivetta M *et al.* Radiographic features of cardiogenic pulmonary edema in dogs with mitral regurgitation: 61 cases (1998–2007). *Journal of American Veterinary Medical Association* 2009. 235 (9).
- Ettingher SJ, Benitz AM, Ericsson GF, Cifelli S, Jernigan AD, Longhofer SL, Trimboli W. Effects of enalapril maleate on survival of dogs with naturally acquired heart failure. The Long- Term Investigation of Veterinary Enalapril (LIVE) Study Group. *Journal of the American Veterinary Medicine Association* 1998; 21: 1573-7.
- Haggstrom J, Boswood A, O'Grady M *et al.* Effect of Pimobendan or Benazepril Hydrochloride on Survival Times in Dogs with Congestive Heart Failure Caused by Naturally Occurring Myxomatous Mitral Valve Disease: The QUEST Study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008; 22:1124–1135.
- Kellum HB e Stepien RL. Sildenafil Citrate Therapy in 22 Dogs with Pulmonary Hypertension. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2007; 21:1258–1264.
- Kvart C, Haggstrom J, Pedersen HD *et al.* Efficacy of Enalapril for Prevention of Congestive Heart Failure in Dogs with Myxomatous Valve Disease and Asymptomatic Mitral Regurgitation. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2002; 16:80–88.
- Lefebvre HP, Ollivier E, Atkins CE, Combes B, Concordet D, Kaltsatos V, Baduel L. Safety of Spironolactone in Dogs with Chronic Heart Failure because of Degenerative Valvular Disease: A Population-Based, Longitudinal Study. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2013; 27:1083–1091.

- Lewis T, Swift S, Woolliams JA, Blott S. Heritability of premature mitral valve disease in Cavalier King Charles spaniels. *The Veterinary Journal* 2011; 188: 73–76.
- Lord P, Hansson K, Kvart C e Haggstrom J. Rate of change of heart size before congestive heart failure in dogs with mitral regurgitation. *Journal of Small Animal Practice* 2010; 51: 210–218.
- Menciotti G, Borgarelli M, Aherne M, Haggstrom J, Ljungvall I, Lahmers SM, Abbott JA. Assessment of mitral valve morphology using three-dimensional echocardiography. Feasibility and reference values. *Journal of Veterinary Cardiology* 2016; 18: 156- 167.
- Olsen LH, Fredholm M and Pedersen HD. Epidemiology and Inheritance of Mitral Valve Prolapse in Dachshunds. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1999; 13:448–456.
- Olsen LH, Haggstrom J, Petersen HD. Acquired valvular disease. In: Ettingher SJ e Feldman EC, editors. *Trattato di Clinica Medica Veterinaria* 7th ed. St. Louis Elsevier Saunders 2015; Pag. 1299-1314.
- Oyama MA, Peddle GD, Reynolds CA, Singletary GE. Use of the loop diuretic torsemide in three dogs with advanced heart failure. *Journal of Veterinary Cardiology* 2011; 13: 287-292.
- Peddle GD, Singletary GE, Reynolds CA, Trafny DJ, Machen MC, DVM, Oyama MA. Effect of torsemide and furosemide on clinical, laboratory, radiographic and quality of life variables in dogs with heart failure secondary to mitral valve disease. *Journal of Veterinary Cardiology* 2012; 14: 253-259.
- Pouchelon JL, Chetboul V, Lugardon B *et al.* The effect of benazepril on survival times and clinical signs of dogs with congestive heart failure: Results of a multicenter, prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled, long-term clinical trial. The BENCH (BENazepril in Canine Heart disease) Study Group. *Journal of Veterinary Cardiology* 1999; 1(1).
- Pouchelon JL, Jamet N, Gouni V. Effect of Benazepril on Survival and Cardiac Events in Dogs with Asymptomatic Mitral Valve Disease: A Retrospective Study of 141 Cases–914. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008; 22 :1124–1135.
- Santilli R e Perego M. Patologie del pericardio. In: Santilli RA, Bussadori C, Borgarelli M. *Manuale di cardiologia del cane e del gatto*. 1th ed. Elsevier 2012; pag. 256.
- Santilli RA e Perego M. Elettrocardiografia del cane e del gatto. 1th ed. EDRA MASSON. Ristampa 2014; pag. 87-95.

- Serres F, Chetboul V, Tissier R *et al.* Chordae tendineae Rupture in Dogs with Degenerative Mitral Valve Disease: Prevalence, Survival, and Prognostic Factors (114 Cases, 2001–2006). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2007; 21:258–264.
- Su X, Wei C-C, Machida N, Bishop SP, Hanks GH, Dillon AR, Oparil S, Dell'Italia LJ. Differential Expression of Angiotensin- converting Enzyme and Chymase in Dogs with Chronic Mitral Regurgitation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1999; 31: 1033–1045.
- Tilley LP. *Essentials of canine and feline electrocardiography*. 2th edition Lea and Febiger 1985.
- Woodfield JA, Bauer TG *et al.* Controlled Clinical Evaluation of Enalapril in Dogs With Heart Failure: Results of the Cooperative Veterinary Enalapril Study Group (The COVE study group). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1995 (a); 9: 243-252.
- Woodfield JA, Bauer TG *et al.* Acute and Short-Term Hemodynamic, Echocardiographic, and Clinical Effects of Enalapril Maleate in Dogs With Naturally Acquired Heart Failure: Results of the Invasive Multicenter Prospective Veterinary Evaluation of Enalapril Study. The IMPROVE Study Group. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1995 (b); 9:234-242.

Capitolo 2

Malattia renale cronica nel cane

2.1 Definizione ed epidemiologia

La malattia renale cronica (Chronic Kidney Disease, CKD) è la patologia renale più comunemente riscontrata nel cane e nel gatto, con una prevalenza complessiva stimata dello 0,5-1% nei cani e dell'1-3% nei gatti (Grauer, 2016). Nonostante sia considerata una patologia dell'animale anziano, la CKD si verifica in soggetti di ogni età con frequenza variabile; ad esempio, in uno studio basato sui dati raccolti tra il 1983 ed il 1992, si è visto che il 18% dei cani con CKD aveva meno di 4 anni, il 17% aveva un'età compresa tra 4-7 anni, mentre il 45% aveva oltre 10 anni. Inoltre, anche se i cani sembrano essere meno colpiti dei gatti, l'incidenza di tale malattia aumenta con l'età in modo del tutto analogo (Polzin, 2015).

La CKD può essere definita sia come danno renale presente per almeno 3 mesi, con o senza riduzione della velocità di filtrazione glomerulare (GFR), sia come una riduzione della GFR superiore al 50% per almeno 3 mesi. Tale intervallo di tempo è stato definito in base alla constatazione che l'ipertrofia compensatoria, conseguente al danno renale acuto, può continuare per i 3 mesi successivi all'insulto.

Il danno renale, a sua volta, rappresenta una nefropatia (micro- o macroscopica) individuabile mediante biopsia renale, biomarker ematici, urinari e tecniche di *imaging*. Nel caso della malattia renale cronica, a prescindere dalla causa scatenante, ciò che avviene è una riduzione progressiva ed irreversibile dei nefroni funzionanti, in seguito ad un danno renale che può interessare glomeruli, tubuli, tessuto interstiziale e componente vascolare; a questo si associa un'ipertrofia compensatoria che causa un costante deterioramento della funzionalità renale residua (Polzin, 2015).

2.2 Eziopatogenesi

La CKD riconosce un'eziologia molto varia in quanto può dipendere da numerose patologie congenite, familiari o acquisite (**Tab. 2.1 a e 2.1 b**).

Tabella 2.1 a. Alcune cause di malattia renale cronica acquisita (Modificato da Polzin, 2015).

Alcune cause di malattia renale cronica acquisita nel cane e nel gatto	
<i>Infettive</i>	Batterica (pielonefrite, leptospirosi)
	Micotica (<i>Candida</i> , blastomicosi)
	Parassitaria (leishmaniosi)
	Virale (FIP, FeLV)
<i>Metaboliche</i>	Ipercalcemia
	Ipokaliemia
<i>Neoplasie</i>	Linfosarcoma
	Carcinoma delle cellule renali
	Nefroblastoma
<i>Altre</i>	Nefropatia ostruttiva e nefropatia da reflusso
	Ureteroliti e nefroliti
	Conseguenze di una insufficienza renale acuta

Tabella 2.1 b. Alcuni esempi di malattia renale cronica congenita o familiare (Modificato da Polzin, 2015).

Alcune forme di malattia renale cronica congenita/familiare nel cane e nel gatto	
Cane	Amiloidosi (es. Shar pei, Beagle)
	Displasia (es. Shih tzu, Golden Retriever)
	Glomerulopatia (es. Cocker Spaniel Inglese, Dobermann, Dalmata)
	Malattia policistica (es. Bull Terrier, West Highland White Terrier)
Gatto	Amiloidosi (es. Abissino, Siamese)
	Malattia policistica (es. Persiano, Himalaiano)

In uno studio condotto su 37 biopsie di cani affetti da un incremento della creatinina di origine renale primaria, il 58% ha evidenziato nefrite tubulointerstiziale, il 28 % glomerulonefropatia e il 6 % amiloidosi. Le glomerulonefropatie sono state associate ad una serie di processi neoplastici, metabolici ed infiammatori; così come la malattia periodontale è stata collegata a microlesioni renali nel cane, senza però, una relazione causa-effetto ben determinata (Polzin, 2015).

Riconoscere quali, tra le numerose cause riportate nelle **tabelle 2.1 a e 2.1 b**, sia quella scatenante il danno parenchimale renale costituirebbe un importante vantaggio per migliorare il trattamento e la prognosi. Tuttavia, risulta spesso difficile individuare l'eziologia al momento della diagnosi, a causa di alcuni fenomeni legati all'evoluzione stessa della CKD; tra questi, primo tra tutti, è l'interdipendenza dei diversi componenti del nefrone (glomeruli, capillari peritubulari, tubuli e tessuto interstiziale), che influenza l'esito finale di un processo patologico. Le lesioni irreversibili, inizialmente localizzate in una parte del nefrone (es. il glomerulo), si diffondono alle altre componenti, tra cui quella vascolare, riducendo la perfusione capillare peritubulare; quest'ultima induce importanti conseguenze quali atrofia e necrosi delle cellule epiteliali tubulari (Polzin, 2015).

Un ruolo importante sembra essere svolto anche dalla proteinuria glomerulare, provocata dall'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS): nell'ambito della CKD, infatti, l'attivazione di tale sistema si associa ad una vasocostrizione preferenziale delle arteriole post-glomerulari che migliora la velocità di filtrazione glomerulare da un lato, ma dall'altro induce ipertensione intraglomerulare; l'esito finale è una condizione di ipoperfusione e conseguente proteinuria (Polzin, 2015). La quantità eccessiva di proteine ultrafiltrate induce, a sua volta, un eccessivo riassorbimento a livello tubulare che danneggia le cellule (Meyer, 2003); ciò è supportato dall'osservazione che la velocità della progressione della patologia si correla ad una maggiore proteinuria. Inoltre, i risultati di uno studio clinico hanno rivelato che la proteinuria è un fattore di rischio di uremia e morte sia in cani che gatti con nefropatia spontanea; inoltre, il rischio di morte associato a CKD aumentava del 60% per ciascun punto del rapporto PU/CU oltre il valore di 1 (Polzin, 2015).

I fenomeni appena descritti vengono esacerbati da fenomeni infiammatori come l'afflusso di linfociti T e macrofagi, che peggiorano le lesioni tubulari; e da fenomeni fibrotici rappresentati dalla sostituzione dei nefroni deteriorati con tessuto connettivo fibroso, nel tentativo di riparare il danno, ma con la sola conseguenza di ridurre le dimensioni renali. Questi meccanismi maladattativi si verificano a prescindere dall'eziologia e più la malattia renale progredisce, più è impossibile distinguere l'eziologia primaria dell'insulto; tuttavia, anche se si tratta di un danno irreversibile, è fortemente raccomandato ridurre al minimo ogni altro ulteriore danno a carico dei nefroni, attuando strategie terapeutiche mirate (Polzin, 2015).

2.3 Diagnosi di CKD

La cronicità di una lesione renale si stabilisce valutando la durata della malattia sulla base dell'anamnesi, di un corretto esame clinico, del trend dei parametri di laboratorio e della valutazione delle lesioni visibili con la diagnostica per immagini.

Una storia clinica caratterizzata da calo ponderale, inappetenza, vomito, poliuria e polidipsia, che duri da almeno tre mesi, è già indicativa di una patologia renale cronica; così come il rilevamento, all'esame clinico, di un mantello scadente ed uno scarso *Body Condition Score* (BCS).

I rilievi clinici, unitamente all'andamento negativo di creatinina sierica, proteinuria ed anemia non rigenerativa, sono specchio di una condizione

cronica in cui il rene non svolge più adeguatamente la sua funzione (Grauer, 2010; Polzin, 2015).

2.4 Manifestazioni cliniche della CKD

2.4.1 Poliuria e polidipsia

Le manifestazioni cliniche iniziali, nonché le più comuni, sono poliuria, polidipsia e, talvolta, nicturia, dovute alla ridotta capacità renale di concentrare le urine. La poliuria avviene in seguito al sovraccarico di soluti per ogni nefrone vitale, allo sconvolgimento sia dell'architettura renale midollare che del sistema moltiplicatore controcorrente e alla mancata risposta all'ormone antidiuretico (*Anti Diuretic Hormone* –ADH). La polidipsia è una diretta conseguenza della poliuria e, se l'aumento dell'assunzione di liquidi non riesce a compensare le relative perdite, si instaura una condizione di disidratazione (Polzin, 2015).

2.4.2 Sindrome Uremica

La sindrome uremica deriva dalla compromissione delle funzioni glomerulari, tubulari ed endocrine del rene, con conseguente sviluppo di tre principali meccanismi: escrezione alterata degli elettroliti e dell'acqua, ridotta escrezione dei soluti organici e ridotta sintesi ormonale. Il primo meccanismo si verifica perché la GFR ridotta induce un aumento del carico escretore di elettroliti per ogni nefrone; quando il declino della GFR e, quindi la perdita di massa renale funzionante, arriva al 75%, i nefroni restanti devono espellere ognuno il quadruplo del sodio. A lungo andare questa compensazione dell'equilibrio idro-elettrolitico si esaurisce, esitando nello stadio terminale della malattia. I segni clinici sono rappresentati principalmente da: edema, ipertensione, iperfosfatemia, iponatriemia, iperkaliemia e acidosi metabolica.

La riduzione dell'escrezione dei soluti è una diretta conseguenza di un'assenza di regolazione attiva, nella fase escretoria, di tali sostanze (Meyer e Hostetter, 2007); a differenza degli elettroliti, infatti, i soluti organici non sono regolati (se non dalla filtrazione glomerulare stessa) e anche un minimo decremento della GFR, induce un repentino aumento degli stessi a livello ematico (Polzin, 2015). Più di 100 potenziali soluti uremici sono stati elencati dall'*European Uremic Toxin Work Group*, che

ha trovato non poche difficoltà nello stabilire se tali sostanze fossero vere e proprie tossine uremiche (Meyer e Hostetter, 2007).

Infine si verifica una riduzione della sintesi ormonale renale, ovvero di calcitriolo, eritropoietina (EPO), prostaglandine e renina; i primi due hanno un ruolo decisamente più consolidato nella patogenesi della CKD. Carenze nella produzione di calcitriolo (forma metabolicamente attiva della vitamina D) possono provocare un iperparatiroidismo secondario ed osteodistrofia renale, a causa del mancato feedback negativo sulla sintesi di paratormone (PTH). Questo, se raggiunge concentrazioni ematiche eccessive, diventa una vera e propria tossina.

La ridotta sintesi di EPO, invece, provoca una tipica anemia non rigenerativa; l'ematocrito dei pazienti affetti da tale patologia può essere decisamente basso, ma i sintomi si attenuano con la correzione dell'anemia. Altre importanti conseguenze della sindrome uremica, sono di tipo gastrointestinale (nausea, vomito, riduzione dell'appetito, diarrea e fenomeni emorragici); cardiovascolari (ipertensione arteriosa che si instaura con un persistente aumento della pressione sistolica e/o diastolica); neuromuscolari, ovvero encefalopatie metaboliche (stato mentale alterato, convulsioni) e neuropatie periferiche (atassia, tremori, mioclonie e polimiotomie ipokaliemiche) (Polzin, 2015).

2.5 Rilievi ematobiochimici della CKD

Uno dei principali riscontri di laboratorio in corso di CKD è sicuramente uno stato di acidosi metabolica che deriva essenzialmente dalla ridotta capacità di eliminare ioni idrogeno, conseguenza di una ridotta escrezione ammoniacale dovuta al progressivo deterioramento renale (Elliott *et al.*, 2003). I segni clinici dello squilibrio acido-base sono vari: anoressia, vomito, nausea, letargia, astenia e dimagrimento; in oltre, in caso di acidemia grave la gittata cardiaca può essere ridotta, così come la pressione arteriosa ed il flusso epato-renale, con centralizzazione del volume ematico rappresentato dalla vasodilatazione delle arterie periferiche e alla venocostrizione centrale (Adroguè e Madias, 1998).

Un'altra importante conseguenza ematobiochimica è l'aumento delle concentrazioni ematiche di urea o altri composti azotati non proteici nel sangue (Blood Urea Nitrogen e creatinina) che derivano tutti dal catabolismo proteico; quando, in corso di CKD, la GFR si riduce, il tasso ematico dei cataboliti proteici aumentano e di conseguenza anche i composti azotati (Polzin, 2015).

Infine si assiste ad un importante squilibrio elettrolitico caratterizzato da iperfosfatemia, la cui prima conseguenza è la progressione stessa della CKD; le concentrazioni sieriche di fosforo sono direttamente collegate all'aumento della mortalità nei pazienti umani, nei gatti e nei cani affetti da CKD (Block *et al.*, 1998). Inoltre s'instaurano condizioni di ipercalcemia, ipermagnesiemia e ipokaliemia; quest'ultima sembra non essere comune nei cani colpiti da insufficienza renale cronica e non sottoposti a terapia, anzi è un disturbo che si verifica principalmente come complicanza iatrogena della fluidoterapia (Polzin, 2015).

2.6 Rilievi radiografici, ecografici ed anatomopatologici

Un esame radiografico standard dell'addome può mostrare essenzialmente la presenza di reni di piccole dimensioni oppure di un rene ipertrofico ed il controlaterale di dimensioni ridotte, a conferma dell'ipertrofia compensatoria. L'esame ecografico può evidenziare iperecogenicità della corticale renale, con perdite della normale linea di confine con la regione midollare (perdita del rapporto cortico-midollare); questo rilievo è causato dalla sostituzione, con tessuto fibroso cicatriziale, dei nefroni danneggiati irreversibilmente. Inoltre può essere presente il cosiddetto “*medullary rim sign*”, che consiste in una banda iperecogena midollare parallela alla giunzione cortico-midollare (**Fig. 2.1**) e che si associa a diverse malattie renali (nefropatia ipercalcemica, avvelenamento da glicole etilenico, leptospirosi e linfoma renale); tale segno ecografico si riscontra anche in cani e gatti clinicamente normali. Alcuni autori suggeriscono che possa essere un segno preclinico di malattia renale, senza una reale dimostrazione scientifica (Benvenuti, 2013; Hart *et al.*, 2013).

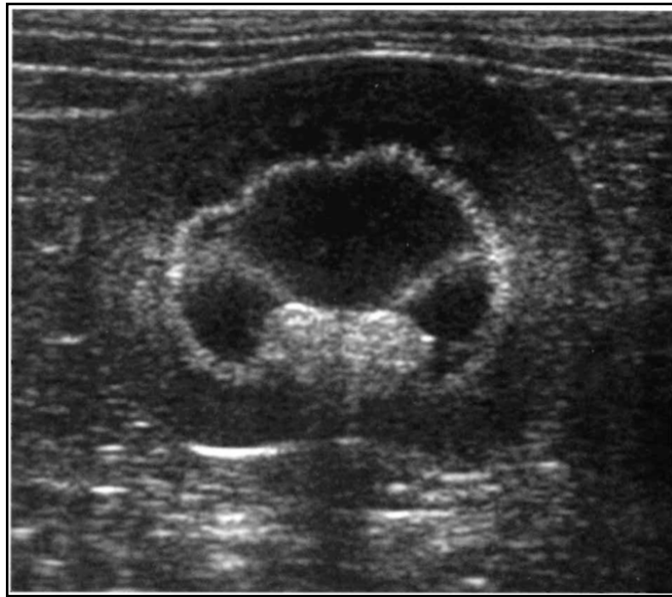


Fig. 2.1. Medullary rim sign nel rene di un gatto (Modificato da Benvenuti, 2013)

Gli studi di *imaging*, inoltre, consentono di identificare o escludere la presenza di altre cause sottostanti, quali una pielonefrite (**Fig. 2.2**) o una calcolosi renale (**Fig. 2.3**)



Fig. 2.2. Immagine ecografica di pielonefrite (Modificato da Kirsch e Clements, 2017)

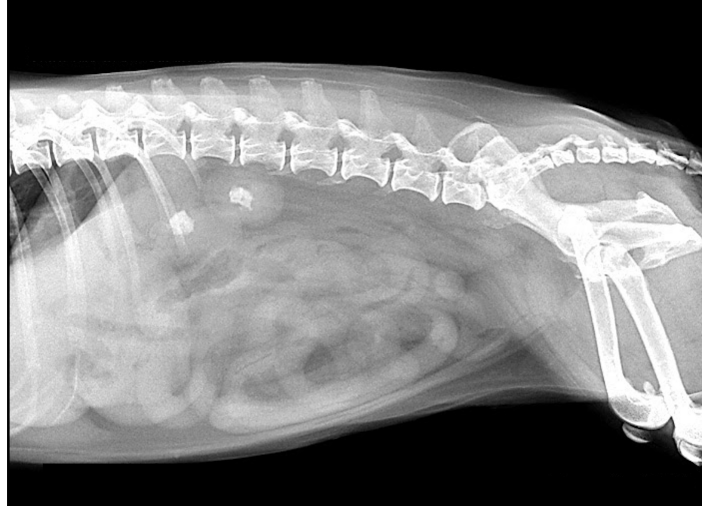


Figura 2.3. Immagine radiografica di calcoli renali (Modificato da http://www.kongyuensing.com/laws/20131113AAkidney_two_stones_dog.jpg)

Nei casi in cui la diagnosi è dubbia, si ricorre all'esame biotico: i reperti istologici più frequenti sono caratterizzati dalla perdita dei tubuli renali, sostituiti da fibrosi e aree di mineralizzazione; sclerosi, atrofia glomerulare ed aree di infiltrazione interstiziale da parte di cellule mononucleate (**Fig. 2.4**) (Grauer, 2010).

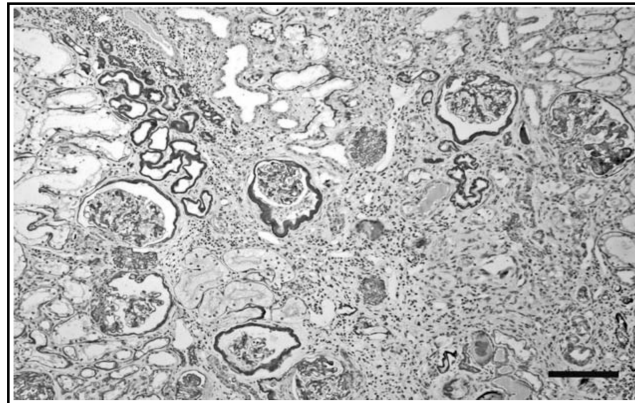


Fig. 2.4. Immagine di microscopia ottica di danno tubulo-interstiziale grave con atrofia e dilatazione tubulare, infiltrazione di cellule monucleate e fibrosi interstiziale (Modificato da Yabuki et al., 2010).

2.7 Stadiazione IRIS

L'*International Renal Interest Society* (IRIS) è una società fondata nel 1998 e costituita, attualmente, da 15 membri (medici veterinari ricercatori) provenienti da 10 nazioni. Il loro obiettivo è, da sempre, quello di aiutare i medici veterinari a diagnosticare precocemente le patologie renali nel cane e nel gatto, al fine di attuare una migliore terapia e di monitorare adeguatamente il paziente nel tempo. Uno dei principali strumenti fornito da questa società è costituito dalle linee guida per la gestione del danno renale acuto (*Acute Kidney Injury*, AKI) e della CKD, che consentono di stadiazione le due patologie; inoltre, tali linee guida, accettate dalla *American and European Societies of Veterinary Nephrology and Urology*, sono in continua evoluzione in base alle nuove scoperte. Per l'insufficienza renale cronica, è stata creata una stadiazione sulla base di 3 parametri: la creatinina sierica (sCr), la proteinuria, intesa come rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria (PU/CU) e la pressione arteriosa sistolica (Polzin, 2015; <http://www.iris-kidney.com>).

In base alla sCr, sono stati individuati quattro stadi, ognuno dei quali corrisponde ad una caratterizzazione clinica del paziente (**Fig. 2.5**).

Stage	Blood creatinine $\mu\text{mol/l}$ mg/dl		Comments
	Dogs	Cats	
At risk	<125 <1.4	<140 <1.6	History suggests the animal is at increased risk of developing CKD in the future because of a number of factors (such as, exposure to nephrotoxic drugs, breed, high prevalence of infectious disease in the area, or old age).
1	<125 <1.4	<140 <1.6	Nonazotemic. Some other renal abnormality present (such as, inadequate urinary concentrating ability without identifiable nonrenal cause, abnormal renal palpation or renal imaging findings, proteinuria of renal origin, abnormal renal biopsy results, increasing blood creatinine concentrations in samples collected serially).
2	125 – 180 1.4 – 2.0	140 – 250 1.6 – 2.8	Mild renal azotemia (lower end of the range lies within reference ranges for many laboratories, but the insensitivity of creatinine concentration as a screening test means that animals with creatinine values close to the upper reference limit often have excretory failure). Clinical signs usually mild or absent.
3	181 – 440 2.1 – 5.0	251 – 440 2.9 – 5.0	Moderate renal azotemia. Many extrarenal clinical signs may be present.
4	>440 >5.0	>440 >5.0	Increasing risk of systemic clinical signs and uraemic crises

Fig. 2.5. Concentrazioni di sCr valide per la stadiazione della CKD nei cani di media taglia (variabili per cani di grossa taglia) (Modificato da <http://www.iris-kidney.com>).

Idealmente, per fare diagnosi di CKD in un animale bisognerebbe monitorare la creatininemia per diverse settimane, in un paziente a digiuno e ben idratato; inoltre si dovrebbero sempre tenere in considerazione tutte le variabili che influiscono sulla sCr, quali le variazioni inter-laboratorio, caratteristiche specifiche del soggetto (razza, sesso, massa muscolare, età), eventi transitori pre-renali e post-renali. Infine è importante valutare, in associazione alla sCr, la capacità del soggetto di concentrare adeguatamente le urine (peso specifico normale nel cane: >1030; nel gatto: > 1035-1040). Si deduce, quindi, un altro concetto importante, ovvero che la diagnosi analitica di CKD non va fatta solo sulla base della creatininemia, ma considerando più parametri e lo stato clinico globale dell'animale (Polzin, 2015).

I pazienti con CKD agli stadi 1 e 2 generalmente non mostrano segni clinici importanti, salvo poliuria e polidipsia; essi potrebbero essere proteinurici e/o ipertesi e presentare sintomi legati a questi aspetti della nefropatia. E' necessaria, quindi, una valutazione complessiva del soggetto e formulare un trattamento specifico, laddove è diagnosticata la nefropatia primaria. Lo stadio 3 si caratterizza per un moderato aumento della creatinina, più o meno associata a segni clinici che si manifestano a seconda della velocità di progressione della CKD, per cui la terapia deve mirare, come già detto, anche ad eliminare i fattori di progressione. Infine, lo stadio 4 comprende i soggetti a rischio di crisi uremiche e prevede terapie finalizzate a gestire segni clinici sistemici gravi (Polzin, 2015).

In base al PU/CU, l'IRIS individua tre stadi: non proteinurico, proteinurico borderline e proteinurico (**Fig. 2.6**); il paziente non proteinurico o borderline è definibile anche come 'microalbuminurico', anche se il ruolo prognostico della microalbuminuria nel cane ancora non è stato chiarito. La misurazione di tale parametro deve essere fatta dopo aver escluso la presenza di infiammazioni del tratto urinario, ematuria e stati di disproteinemia; tutte queste condizioni, infatti, aumentano il contenuto cellulare e proteico del campione urinario, rischiando di sovrastimare la reale proteinuria, di origine renale, del nostro paziente (Lees *et al.*, 2005). Inoltre, come per la sCr, anche nel caso del PU/CU si dovrebbero eseguire 2-3 misurazioni nel corso di almeno 2 mesi e, laddove il soggetto risulti borderline, occorre una rivalutazione dopo 2 mesi (Polzin, 2015).

UP/C value		Substage
Dogs	Cats	
<0.2	<0.2	Non-proteinuric
0.2 to 0.5	0.2 to 0.4	Borderline proteinuric
>0.5	>0.4	Proteinuric

Figura 2.6. Stadiazione in base al rapporto PU/CU (Modificato da <http://www.iris-kidney.com>).

Infine, viene considerata la pressione arteriosa sistolica (PAS), da valutare con misurazioni multiple e solo dopo aver fatto ambientare (e quindi tranquillizzare) il soggetto. In base alla media di tutte le determinazioni eseguite, l'IRIS distingue 5 stadi di seguito riportati (**Fig. 2.7**).

Systolic Blood Pressure mm Hg	Blood Pressure Substage	Risk of Future Target Organ Damage
<150	Normotensive	Minimal
150 – 159	Borderline hypertensive	Low
160 – 179	Hypertensive	Moderate
≥ 180	Severely hypertensive	High

Figura 2.7. Classificazione IRIS in base alla PAS (Modificato da <http://www.iris-kidney.com>).

Quest'ultima stadiazione classifica i pazienti anche in base al rischio di un 'danno d'organo bersaglio' (*Target Organ Damage*, TOD) ovvero alterazioni oftalmologiche, neurologiche, renali e cardiovascolari, delineando un quadro prognostico molto più dettagliato (Stepien, 2015). Inoltre, le linee guida, riportano due concetti importanti in merito alla pressione arteriosa. Il primo è che esistono valori pressori razza-specifici: ad esempio nei levrieri (Greyhounds e Deerhounds) la PAS risulta fisiologicamente più elevata rispetto ad altre razze, approssimativamente di 10-20 mm Hg (Bodeyand e Ramplin, 1999; Brown *et al.*, 2007); tali peculiarità vanno considerate al momento della valutazione pressoria di tali pazienti e del relativo rischio di danno d'organo (**Tab. 2.2**).

Tabella 2.2. Classificazione del rischio di danno d'organo (Modificato da <http://www.iris-kidney.com>).

Rischio minimo	pressione sistolica < 10 mmHg superiore al range di riferimento specifico della razza
Rischio basso	pressione sistolica 10-20 mmHg superiore al range di riferimento specifico della razza
Rischio moderato	pressione sistolica 20-40 mmHg superiore al range di riferimento specifico della razza
Rischio elevato	pressione sistolica > 40 mmHg superiore al range di riferimento specifico della razza

Il secondo aspetto evidenziato è la possibile *persistenza* di una PAS elevata, ovvero una pressione che si mantiene elevata nel tempo, sulla base di misurazioni multiple; questo aspetto, anche in assenza di segni di danno d'organo, assume un importante significato clinico e prognostico (**Tab. 2.3**).

Tabella 2.3. Classificazione degli stati ipertensivi (Modificato da <http://www.iris-kidney.com>).

Stato ipertensivo	pressione arteriosa sistolica da 160 a 179 mmHg misurata in 1 o 2 mesi
Stato ipertensivo grave	pressione arteriosa sistolica maggiore o uguale a 180 mmHg misurata in 1 o 2 settimane

2.8 Prognosi

Al fine di emettere una prognosi di CKD, quanto più accurata possibile, bisogna considerare diversi aspetti: innanzitutto la natura della nefropatia primaria e, quindi, la possibilità di applicare una terapia specifica risolutiva; la gravità e la durata dei sintomi clinici e delle complicanze più gravi legate all'uremia; la probabilità di migliorare la funzionalità renale, ovvero valutare una condizione di reversibilità (soprattutto di condizioni pre-renali, post-renali e renali acquisite di recente); la velocità di evoluzione della patologia con e senza terapia ed, infine, l'età del paziente. Tutti questi fattori condizionano l'*outcome* dei nostri pazienti, che devono essere quindi valutati accuratamente per fornire un'adeguata prognosi ai proprietari che, in tal modo, decideranno con maggiore consapevolezza quale trattamento attuare.

Inoltre, è importante evidenziare che i cani affetti da CKD hanno una prognosi nettamente peggiore dei gatti affetti dalla stessa patologia; ciò accade, probabilmente, perché nella specie canina sono molto più frequenti le malattie renali proteinuriche e la proteinuria, come già discusso, è un fattore prognostico negativo in corso di CKD. A ciò si può associare una concomitante ipertensione arteriosa, che risulta più dannosa in presenza di proteinuria ed è più difficile da trattare nella specie canina, piuttosto che in quella felina (Polzin, 2015).

2.9 Cenni di terapia in corso di insufficienza renale cronica

Il trattamento della CKD dovrebbe includere una terapia specifica per il processo eziopatogenetico responsabile ed un trattamento medico conservativo diretto alle complicazioni della funzione renale ridotta. Poiché non sempre si ottiene una diagnosi eziologica e le lesioni sono irreversibili, spesso la terapia specifica non risolve la patologia, ma può rallentare o bloccare nefropatie attive.

La mancanza di una terapia specifica efficiente rende necessario un trattamento medico conservativo per l'insufficienza renale cronica, con i seguenti obiettivi: migliorare i sintomi clinici dell'uremia, ridurre i disturbi associati agli incrementi o alle perdite degli elettroliti, sostenere una nutrizione adeguata in base ai fabbisogni quotidiani di proteine, calorie e minerali e modificare la progressione dell'insufficienza renale (Polzin, 2015).

2.9.1 Trattamento dietetico

La terapia dietetica continua ad essere una colonna portante del management del paziente affetto da CKD; in passato il ruolo chiave nelle diete di questi soggetti era attribuito alla riduzione del contenuto proteico, mentre attualmente sono disponibili diete con modificazioni di molti altri nutrienti al fine di bilanciare al meglio le carenze dei pazienti colpiti. Le modifiche nutrizionali sono rappresentate da un ridotto contenuto di fosforo e sodio, un aumento del contenuto della vitamina B, un effetto neutro sull'equilibrio acido-base, un'integrazione con acidi grassi polinsaturi (PUFA) $\omega 3$ e l'aggiunta di antiossidanti.

L'efficacia della terapia dietetica, per minimizzare gli episodi uremici e la mortalità nel cane con CKD spontanea, è stata dimostrata in diversi studi che hanno messo a confronto una dieta specifica per CKD con un prototipo di dieta di mantenimento per il cane; il rischio di sviluppare una sindrome uremica era ridotto di circa il 75 % nei cani alimentati con dieta renale. Le diete renali sono raccomandate particolarmente per i cani con stadio 3 e 4 di CKD e sembrano avere una certa validità nel ridurre l'entità della proteinuria nei cani affetti (Polzin, 2015).

2.9.2 Correzione dell'iperfosfatemia

In condizioni di normalità le concentrazioni sieriche di fosforo sono mantenute stabili dall'equilibrio tra apporto alimentare ed escrezione renale; in caso di perdita di funzionalità renale, come accade nella CKD, bisognerà quindi agire solo sull'apporto di fosforo. Se non si ricorre ad una terapia mirata, la maggior parte dei cani e dei gatti con CKD in stadio 2 o stadio 4 mostreranno iperfosfatemia ed iperparatiroidismo renale secondario.

Dopo un corretto ripristino dello stato di idratazione, bisogna attuare una restrizione alimentare di fosforo, impiegando specifiche diete medicate e somministrando chelanti del fosforo a livello intestinale, come idrossido di alluminio, acetato di calcio e carbonato di lantanio (Polzin, 2015).

2.9.3 Fluidoterapia

Gli scopi principali della fluidoterapia in corso di CKD sono quelli di ristabilire una corretta idratazione del soggetto e correggere le condizioni di ipokaliemia e di acidosi metabolica. L'equilibrio idrico in pazienti con poliuria è mantenuto dalla polidipsia compensatoria; quando tale compensazione diventa insufficiente, si instaura una disidratazione cronica, che può essere peggiorata da ulteriori perdite (vomito e diarrea).

E' possibile, quindi, attuare una terapia liquida sottocutanea a lungo termine o per via endovenosa con il soggetto ospedalizzato, utilizzando una soluzione elettrolitica bilanciata (es. Ringer lattato) e calcolando la quantità di fluidi da somministrare in base al fabbisogno idrico giornaliero, al grado di disidratazione e alle perdite (fisiologiche e patologiche) (Langston, 2009; Polzin, 2015).

L'ipokaliemia è raramente osservata nel cane, tuttavia in corso di CKD può essere causata dai seguenti fattori: un apporto alimentare insufficiente (che comporta una deplezione sia muscolare che sierica di potassio) e l'aumento delle perdite (dovute al vomito, perdita di peso, anoressia e poliuria). Un animale affetto da ipokaliemia cronica, avrà anche un deficit corporeo totale di potassio che, del resto, sembra essere più comune rispetto alla sola riduzione ematica (Theisen *et al.*, 1997; Polzin, 2015). L'integrazione orale è la via più sicura ed efficace per la supplementazione del potassio (sotto forma di sali di gluconato e di citrato); in alternativa, si può aggiungere cloruro di potassio ai fluidi somministrati per via endovenosa, con una dose massima di 80 mEq/l (Anastasio *et al.*, 2014).

Infine, è essenziale correggere l'acidosi metabolica e tutte le relative conseguenze sistemiche, quali: effetti catabolici sul metabolismo proteico, danno scheletrico (demineralizzazione) ed effetti cardiovascolari (compromissione della contrattilità miocardica ed aumento della vasocostrizione). La terapia alcalinizzante è raccomandata nei pazienti classificati negli stadi IRIS 1-4 in cui il pH ematico sia inferiore a 7,1 e la concentrazione dei bicarbonati sia inferiore a 15 mmol/l (Adroguè e Madias, 1998; Polzin, 2013). Inizialmente si somministra una dieta neutra o lievemente alcalinizzante, ma, se dopo numerose settimane non si ottiene l'effetto desiderato, si deve ricorrere alla terapia alcalinizzante, sempre per via orale, con bicarbonato di sodio e citrato di potassio; la risposta del paziente deve essere monitorata eseguendo l'emogas analisi 10-14 giorni dopo l'inizio della terapia (Polzin, 2015).

Sebbene la fluidoterapia sottocutanea sia appropriata per un trattamento ambulatoriale di cani e gatti affetti da CKD, in corso di crisi uremica è obbligatorio ricorrere alla somministrazione endovenosa bilanciata di fluidi isotonici come la soluzione Ringer Lattato. La quantità di liquidi da somministrare si calcola tenendo conto innanzitutto del deficit idrico del paziente, moltiplicando la percentuale di disidratazione dell'animale per i kg di peso corporeo; questo volume si ripristina mediamente in 12-36 ore, considerando l'evenienza di dover applicare una velocità di somministrazione maggiore (in caso di collasso ipovolemico) o inferiore (in caso di un paziente cardiopatico). Poi bisogna valutare il fabbisogno idrico fisiologico del paziente ed il volume delle perdite potenzialmente in corso (vomito, poliuria), applicando rispettivamente una fluidoterapia di mantenimento e di integrazione. Infine se il paziente è dotato di un sondino alimentare, questo può essere usato ugualmente per somministrare fluidi; quando i valori di sCr rientrano nei range di riferimento, la fluidoterapia endovenosa può essere sospesa ed il paziente dimesso (Langston, 2009; Elliott e Watson, 2014).

2.9.4 Trattamento dell'ipertensione arteriosa

L'ipertensione arteriosa, nel cane e nel gatto, riconosce come causa più frequente la CKD e si associa a complicanze renali, oculari, neurologiche e cardiovascolari; inoltre, in entrambe le specie, è correlata ad una maggiore proteinuria (Polzin, 2015).

L'insorgenza di ipertensione arteriosa in cani affetti da CKD è considerata un importante fattore di rischio per lo sviluppo di crisi uremiche e di

mortalità; quindi, laddove siano presenti lesioni d'organo target o pressioni sanguigne sistoliche superiori a 200 mmHg (misurate tre volte nel corso di tre visite successive), bisogna iniziare il trattamento antipertensivo. In particolare, vanno presi in considerazione i pazienti in stadio 2 (o superiore) e condizioni di pressione arteriosa persistentemente superiore a 160/100 mmHg; così pure i pazienti in stadio 1 e con pressione sanguigna costantemente superiore a 180/120 mmHg (Brown *et al.*, 2007). L'obiettivo della terapia è di ridurre la PAS almeno sotto 150/95 mmHg attraverso l'utilizzo degli ACE-inibitori (enalapril, benazepril) e dell'amlodipina; tali principi attivi hanno notevoli effetti reno-protettivi e sono considerati i pilastri della terapia ipertensiva nel cane e nel gatto. In particolare gli ACE-inibitori esplicano la loro azione reno-protettiva, riducendo la pressione intraglomerulare, quindi la proteinuria, e limitando gli effetti profibrotici dell'angiotensina II sui reni (Polzin, 2015).

2.9.5 Trattamento dell'anemia

L'anemia in corso di CKD è di origine multifattoriale perché può essere causata da emorragie gastrointestinali (evidenti od occulte), un'alimentazione inadeguata, una ridotta durata di vita degli eritrociti ed un'insufficiente produzione renale di eritropoietina (EPO). Le emorragie gastrointestinali, in corso di CKD, sono generalmente croniche, di basso grado e, spesso, occulte; tuttavia possono essere svelate indirettamente sia ricercando la presenza di uno stato carenziale di ferro, una microcitosi ed un aumentato rapporto BUN/creatinina, sia somministrando antagonisti dei recettori H₂ per l'istamina ed il sucralfato. Il miglioramento dell'ematocrito e dell'appetito, successivo a tale terapia, indica una risposta positiva e conferma una genesi emorragica dell'anemia (Polzin, 2015). Un'anemia da carenza di ferro, invece, deve essere accuratamente diagnosticata e, solo dopo, va iniziato il trattamento con l'integrazione orale di solfato ferroso (farmaco di prima scelta) o ferro destrano per via intramuscolare.

Altre soluzioni terapeutiche prevedono sia l'utilizzo di steroidi anabolizzanti, nonostante la relativa esperienza clinica non sia risultata molto soddisfacente; sia una trasfusione di sangue (in particolare di eritrociti concentrati o sangue intero) che è richiesta nei pazienti con CKD affetti da una grave anemia e nei soggetti in cui si mira ad un mantenimento a lungo termine dell'ematocrito. Infine si può ricorrere al trattamento con eritropoietina, di cui la forma più adoperata è la rHuEPO (eritropoietina ricombinante umana); essa è diventata il trattamento di

prima scelta da attuare in gatti e cani anemici colpiti da CKD, quando essi raggiungono valori di ematocrito inferiori al 20 %. La rHuEPO va somministrata solo dopo aver escluso e/o corretto tutte le altre possibili cause, tenendo conto di due aspetti importanti: essa causa un aumento dose dipendente dell'ematocrito e, soprattutto, è necessaria la somministrazione contestuale di ferro, per consentire una eritropoiesi efficace. La seconda forma di EPO, modificata strutturalmente, è la darbepoietina che estende la sua durata di attività e che sembra avere un minor potere immunogenico (Polzin, 2015).

2.9.6 Rimodulazione delle terapie in corso di concomitante CKD

I reni, in condizioni fisiologiche, sono responsabili dell'eliminazione di molti farmaci, per cui, con il declino della funzionalità renale, si riduce anche la clearance farmacologica e si verifica un accumulo ematico di sostanze potenzialmente nefrotossiche. A questo si associano, in corso di malattia renale cronica, due difetti del legame proteico: un gruppo di farmaci acidi (es. teofillina, diazepam, digossina) mostra una riduzione del legame proteico, con conseguente aumento della frazione libera del principio attivo in circolo; si rende, quindi, necessario ridurre la loro dose, per evitare il raggiungimento di livelli tossici. Al contrario un gruppo di farmaci alcalini (es. propranololo o cimetidina) aumentano il legame proteico, inducendo l'aumento dei dosaggi per ottenere gli effetti terapeutici desiderati. L'esito globale è un accumulo farmacologico potenzialmente responsabile di reazioni avverse e nefrotossicità; per cui in un paziente con nefropatia cronica, risulta indispensabile fare una rassegna dei farmaci correntemente in uso, rilevare i possibili effetti avversi renali e modificare le dosi in base alla GFR (Polzin, 2015).

- Adrogué HJ e Madias NE. Management of life-threatening acid-base disorders, First of Two Parts. *The New England Journal of Medicine* 1998; 338:1.
- Anastasio JD, Fletcher DJ e Rozanski EA. Crystalloid Fluid Therapy. In: Bonagura JD and Twedt DC. *Kirk's Current Veterinary Therapy*. XV ed. St. Louis: Elsevier Saunders 2014; pag. 2-7.
- Benvenuti L. Vie urinarie superiori (rene ed uretere). In: Rossi F e Spattini G. *Manuale di ecografia clinica veterinaria*. Edizioni veterinarie 2013; pag. 143-153.
- Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW and Port FK. Association of Serum Phosphorus and Calcium x Phosphate Product With Mortality Risk in Chronic Hemodialysis Patients: A National Study. *American Journal of Kidney Diseases* 1998; 31(4):607-617.
- Bodeyand AR e Rampling MW. Comparison of haemorrheological parameters and blood pressure in various breeds of dog. *Journal of Small Animal Practice* 1999; 40: 3-6.
- Brown S, Atkins C, Bagley R, Carr A, Cowgill L, Davidson M, Egner B *et al*. Guidelines for the Identification, Evaluation, and Management of Systemic Hypertension in Dogs and Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2007; 21:542–558.
- Elliott J, Syme HM, Reubens E, Markwell PJ. Assessment of acid-base status of cats with naturally occurring chronic renal failure. *Journal of Small Animal Practice* 2003; 44:65–70.
- Elliott J e Watson ADJ. In: Bonagura JD e Twedt DC. *Kirk's Current Veterinary Therapy*. XV ed. Elsevier Saunders 2014; pag.857-863.
- Grauer GF. Insufficienza renale cronica. In: Nelson RW e Couto CG. *Medicina interna del cane e del gatto*. 4th ed. Elsevier 2010; pag. 655-661.
- Grauer GF. Use of Serum Creatinine & Symmetric Dimethylarginine. *Today's Veterinary Practice* tvpjournal.com. March/April 2016.
- Hart DV, Winter MD *et al*. Ultrasound appearance of the outer medulla in dogs without renal dysfunction. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 2013; 54(6):652–658.
- International Renal Interest Society guidelines (IRIS) 2015. www.iris-kidney.com.
- Kirsch A e Clements C. Case study: Discovering early kidney disease with SDMA. www.idexx.com

- Langston CE. Chronic Renal Failure. In: Silverstein DC e Hopper K. Small Animals Critical Care Medicine. Ed. Saunders Elsevier 2009; pag. 594-598.
- Lees GE, Brown SA, Elliott J, Grauer GF, Vaden SL e ACVIM Consensus Statement. Assessment and Management of Proteinuria in Dogs and Cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (Small Animal). Journal of Veterinary Internal Medicine 2005; 19:377–385.
- Meyer WT. Tubular injury in glomerular disease. Kidney International 2003; 63:774–787.
- Meyer WT, Hostetter TH. Uremia. The New England Journal of Medicine 2007; 357:1316-25.
- Polzin DJ. Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney disease in dogs and cats. Journal of Veterinary Emergency and Critical Care 2013; 23:205–215.
- Polzin DJ. Chronic Kidney Disease. In: Ettingher SJ, Feldman EC, editors. Textbook of Veterinary Internal Medicine. 7th ed. St. Louis: Elsevier Saunders 2015; pag. 1990- 2021.
- Stepien RL. Fisiopatologia dell'ipertensione sistemica e valutazione della pressione sanguigna. In: Ettingher SJ, Feldman EC, editors. Trattato di Clinica Medica Veterinaria 7th ed. St. Louis Elsevier Saunders 2015 pag. 577-58.
- Theisen SK, DiBartola SP, Radin MJ, Chew DJ, Buffington CAT and Dow SW. Muscle Potassium Content and Potassium Gluconate Supplementation in Normokalemic Cats With Naturally Occurring Chronic Renal Failure. Journal of Veterinary Internal Medicine 1997; 11(4):212-217.
- Yabuki A, Mitani S, Fujiki M, Misumi K, Endo Y *et al.* Comparative study of chronic kidney disease in dogs and cats: Induction of myofibroblasts. Research in Veterinary Science 2010; 88:294–9.

Capitolo 3

Biomarker di CKD

3.1 Biomarker tradizionali di CKD

In base alla definizione proposta dal *Biomarkers Definitions Working Group*, “il biomarker è un parametro biologico misurabile obiettivamente come indicatore di un processo fisiologico, patologico o di risposta ad un trattamento farmacologico” (Atkinson *et al.*, 2001). Il gold standard per la diagnosi di insufficienza renale cronica è la misurazione della *Glomerular Filtration Rate* (GFR) che rappresenta un indice diretto della massa renale funzionante. Tale metodo presenta due importanti limiti: il primo è la necessità di somministrare un marker al paziente e di eseguire prelievi multipli (di sangue e/o di urine), che, unitamente all’onere economico di tutta la procedura, rende il test poco maneggevole e scarsamente applicabile nella clinica routinaria (Von Hendy-Willson e Pressler, 2011; Pressler, 2015). Il secondo limite è l’assenza di valori di riferimento assoluti nel cane e nel gatto; infatti in letteratura esiste un range di valori troppo ampio, dovuto alla variabilità dei protocolli; quindi si raccomanda di usare i range stabiliti dal laboratorio adottato (Hall *et al.*, 2014 a). Infine, le diverse formule usate in medicina umana per stimare la GFR attraverso la creatinina sierica (sCr), si sono rivelate inaccurate se applicate nel cane e nel gatto, a causa della notevole variabilità di genere e di razza (Relford *et al.*, 2016).

Nella pratica clinica si utilizza la creatinina sierica (sCr), considerata “il surrogato standard” della stima della GFR (Hall *et al.*, 2016 b) che rappresenta il test più usato per la diagnosi di CKD, grazie alla sua facile esecuzione ed il suo basso costo (Polzin, 2013). Sebbene la sCr soddisfi la definizione di biomarker, essa presenta numerose limitazioni (Relford *et al.*, 2016). In un’interessante review sulla creatinina nel cane sono stati descritti i fattori di variazione interindividuale (età, massa muscolare/peso ed il luogo di abitazione) ed intraindividuale (stagione, ritmi circadiani, sede del prelievo ematico, stato di idratazione ed esercizio fisico). Nello stesso lavoro è stato discusso come alcuni farmaci (es. gentamicina, ossitettraciclina, etc) influenzino la concentrazione di sCr attraverso la riduzione della GFR (Braun *et al.*, 2003) e ribadito che la creatinina supera il valore soglia stabilito per il cane, ovvero di 1,4 mg/dL (IRIS 2015), quando già il 75% circa dei nefroni non è più funzionante.

Infine, è stato descritto che un falso aumento della creatininemia può essere determinato sia da alcune tecniche analitiche sia dalla secrezione endogena (dai tubuli renali) nei cani maschi (Braun *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2016 b) ; tuttavia, gli autori concludono che la creatinina è il miglior

marker indiretto di GFR nei cani se, nella fase interpretativa dei risultati, non si trascura la presenza dei fattori condizionanti sopradescritti, specialmente quando i valori si avvicinano ai limiti più bassi e più alti di riferimento (Braun *et al.*, 2003).

A causa dei suoi limiti, quindi, la sCr sembrerebbe il biomarker meno adatto alla diagnosi precoce di CKD (Von Hendy-Willson e Pressler, 2011); infatti un biomarker renale, per essere considerato ottimale, non dovrebbe essere influenzato dalla massa muscolare, dall'alimentazione e dall'età del soggetto e dovrebbe essere capace di predire o escludere la patologia in un singolo paziente, nell'ambito di una popolazione eterogenea per razza, taglia, età e comorbidità (Puntmann, 2009; Relford *et al.*, 2016).

3.2 Biomarker innovativi di CKD: le Dimetilarginine (SDMA e ADMA)

Visti i limiti legati ai comuni biomarker di CKD finora utilizzati, è stato indagato il ruolo di nuovi parametri di danno renale, ovvero le dimetilarginine nella loro forma simmetrica (SDMA) e asimmetrica (ADMA), che sembrano costituire, almeno nell'uomo, un valido ausilio nella diagnosi precoce di insufficienza renale.

3.2.1 L-arginina e la sintesi delle metilarginine

La L-arginina, nell'uomo, è un amminoacido non essenziale dotato di un gruppo guanidinico carico positivamente, dunque potenzialmente instabile, che viene modificato durante i normali processi di metilazione post-traslazionale nel nucleo di tutte le cellule (Kielstein *et al.*, 2006; Relford *et al.*, 2016).

La metilazione dei residui di L-arginina inglobati nelle proteine è un processo che svolge un ruolo chiave nella trasduzione del segnale, nel trasporto nucleare e nella modulazione delle interazioni degli acidi nucleici (Martens-Lobenhoffer e Bode-Böger, 2007). Tale reazione consiste nella sostituzione degli atomi di azoto guanidinico con gruppi metilici; i residui metilati vengono sottoposti ad un processo di proteolisi ad opera della famiglia degli enzimi N-metiltransferasi proteiche (PRMTs), con la produzione finale di 3 specie di arginine metilate quali la N-MonoMetilarginina (NMMA), la Dimetil Arginina Asimmetrica (ADMA) e la Dimetil Arginina Simmetrica (SDMA) (Bedford e Richard, 2005; Kielstein *et al.*, 2006; Franceschelli *et al.*, 2013; Feliers *et al.*, 2015). In

particolare, le PRMTs tipo I catalizzano una metilazione asimmetrica, producendo la Dimetil Arginina Asimmetrica (ADMA); l'espressione di tali enzimi a livello delle cellule endoteliali aumenta in risposta allo stress ossidativo, inducendo una variazione del rilascio di ADMA (Cooke, 2004). Le PRMTs tipo II, invece, producono l'isomero simmetrico, Dimetil Arginina Simmetrica (SDMA) (**Fig. 3.1**) (Schwedhelm e Böger, 2011).

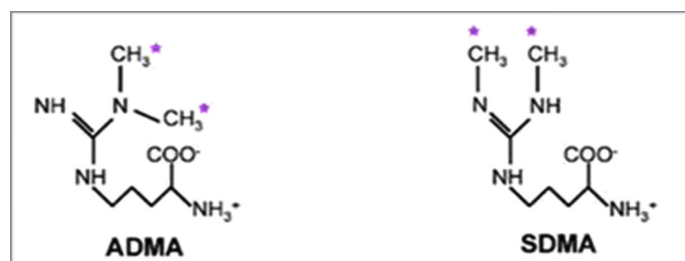


Fig. 3.1. Struttura molecolare delle arginine metilate (ADMA e SDMA) (Modificato da Relford et al., 2016)

Questo fenomeno rappresenta un comune, e costante, processo post-traslazionale delle proteine intracellulari, che ne condiziona la localizzazione e la funzione (Feliers *et al.*, 2015); infatti, durante il turnover proteico, esse vengono rilasciate nel citosol e poi immesse nel circolo ematico (Franceschelli *et al.*, 2013) per seguire diversi *pathway* metabolici (Pedersen, 2006; Martens- Lobenhoffer e Bode-Böger, 2015; Relford *et al.*, 2016) (**Fig. 3.2**).

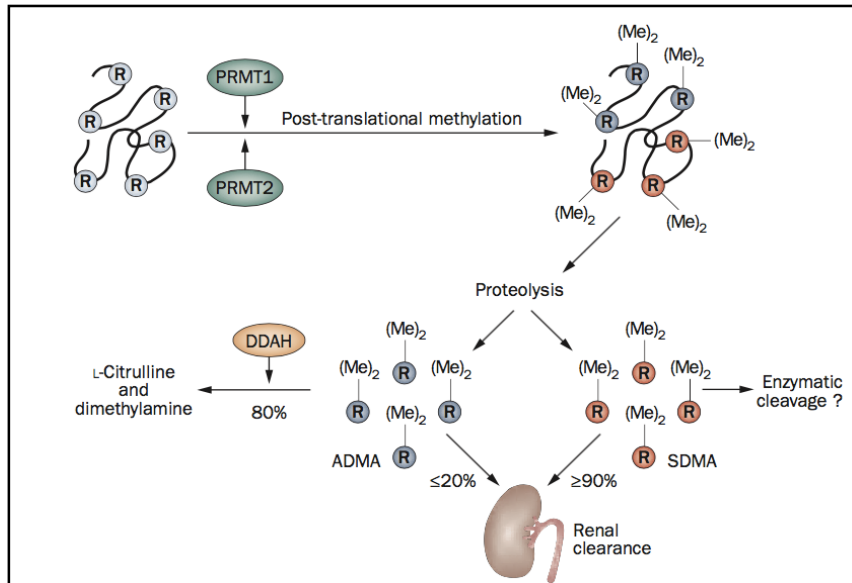


Fig. 3.2. Sintesi e metabolismo della SDMA e dell'ADMA (Schwedhelm e Böger, 2011).

Entrambe le dimetilarginine sono presenti fisiologicamente in basse concentrazioni plasmatiche e vengono escrete per via renale, seppur in modalità differenti (Böger e Zoccali, 2003).

3.2.2 Dimetilarginina simmetrica (SDMA): sintesi e metabolismo

La SDMA è stata identificata per la prima volta, in umana, nel 1970 (Kakimoto e Akazawa, 1970) e, nel 1992, nell'ambito di uno studio sulla patogenicità dell'ADMA effettuato in pazienti con CKD avanzata, essa venne delineata come possibile biomarker renale (Vallance *et al.*, 1992). Gli autori trovarono differenze patogenetiche considerevoli tra le due dimetilarginine, concludendo, in riferimento alla SDMA, che la sua escrezione avviene principalmente attraverso il rene, confermando quanto riportato da McDermott in uno studio condotto sui conigli (McDermott, 1976); infatti, grazie al suo ridotto peso molecolare e alla carica elettrica positiva, tale metilarginina viene filtrata facilmente e principalmente attraverso il rene. Tuttavia, non fu né stabilito un range di riferimento né evidenziato un ruolo attivo della SDMA nella patogenesi della CKD nell'uomo (Vallance *et al.*, 1992; Relford *et al.*, 2016).

In seguito, Marescau e collaboratori hanno rilevato una significativa correlazione tra la SDMA sierico (ed urinario) e la disfunzione renale stimata con la GFR; in questo studio 135 pazienti umani affetti da CKD presentavano, infatti, un declino della GFR e, in modo inversamente proporzionale, un aumento del valore sierico della SDMA, confermando il suo potenziale ruolo di biomarker nella diagnosi precoce di insufficienza renale cronica (Marescau *et al.*, 1997). Kielstein e collaboratori, in diversi studi tra cui una consistente meta-analisi di 18 lavori, hanno confermato questa correlazione, avvalorando l'idea che l'aumento plasmatico della SDMA riflette una progressiva perdita della capacità di escrezione renale (Kielstein *et al.*, 2002; Kielstein *et al.*, 2006).

Schwedhelm e Böger, nel 2011, hanno stimato che la clearance glomerulare della SDMA è superiore o uguale al 90%, candidandola ad essere un ottimo biomarker endogeno di funzionalità renale nell'uomo. Gli autori, tuttavia, affermano anche che una piccola parte di SDMA viene metabolizzata in due modi: una quota viene sottoposta ad una reazione di transaminazione, catalizzata dall'enzima alanine-glyoxylato amino transferasi 2 (AGXT2), generando il composto *symmetric-keto-d-(dimethylguanidino) valeric acid* (DMGV'); un'altra piccola parte di SDMA, invece, va incontro ad acetilazione, producendo la molecola Ac-SDMA (*Symmetric N-alfa- Acetyldimethylarginine*) che viene eliminata totalmente attraverso il rene. La correlazione tra Ac-SDMA e clearance renale della creatinina, infatti, è positiva e maggiore di quella osservata tra SDMA e creatinina, avvalorando l'idea che parte di tale biomarker segue anche altre vie metaboliche (Martens-Lobenhoffer e Bode-Böger, 2015).

Nella specie canina, la via di escrezione della SDMA non è stata ancora documentata, per cui è stata assunta quella descritta in medicina umana; inoltre è stato dimostrato che, a differenza della creatinina, la concentrazione sierica di questa molecola non è influenzata dalla massa magra corporea del cane, ma piuttosto dall'utilizzo di un'alimentazione medicata. Alcuni autori hanno rilevato una significativa riduzione del tasso sierico di SDMA, in beagle sani, alimentati per 6 mesi con un alimento ricco in acidi grassi $\omega 3$ e $\omega 6$ e con basso tenore proteico; tali composti hanno proprietà *anti-aging* che aiutano la funzionalità renale, perché contrastano gli effetti negativi dell'invecchiamento cellulare. La riduzione della SDMA non è altro che l'espressione biochimica del miglioramento della attività renale e potrebbe costituire un vantaggioso strumento per monitorare la risposta agli interventi nutrizionali (Hall *et al.*, 2015 a). Nel 2016, Hall e collaboratori hanno pubblicato i risultati di uno studio

prospettico eseguito su 210 cani geriatrici; tale ricerca eseguita su soggetti affetti da CKD in uno stadio iniziale, ha evidenziato un miglioramento della funzionalità renale in cani alimentati con un *test food* mirato (ricco in antiossidanti ed a contenuto controllato di sodio) rispetto al gruppo di cani controllo nutriti con alimenti scelti dai proprietari. I cani con CKD iniziale (stadio 1) sono stati classificati in base all'ultima modifica preliminare della stadiazione IRIS, secondo cui lo stadio 1 (*early stage kidney disease*) è definito da un aumento persistente di SDMA ($>14 \mu\text{g/dl}$) e livelli di sCr nella norma ($<1,4 \text{ mg/dl}$) (Hall et al., 2016 a).

Analogamente a quanto dimostrato nell'uomo, anche nei piccoli animali la SDMA aumenta proporzionalmente all'età. Nell'uomo è noto che, con la senescenza, la frazione renale di output cardiaco diminuisce e si instaurano modificazioni vascolari (coalescenza dei capillari glomerulari, atrofia delle arteriole glomerulari corticali); tutto ciò comporta, inevitabilmente, che nei soggetti geriatrici ci sia una riduzione della GFR ed un aumento del tasso sierico di SDMA (Schwedhelm et al., 2011; Hall et al., 2016 a). Hall e collaboratori, nel 2014, hanno dimostrato che anche in gatti geriatrici sani, a differenza della creatinina che diminuisce con l'*aging* (a causa dello scadimento muscolare), la SDMA aumenta come conseguenza della diminuzione della GFR e non risulta influenzata dalla massa magra totale misurata con la *dual energy x-ray absorptiometry* (DEXA) (Hall et al., 2014 b). Nel cane geriatrico, invece, la massa renale si riduce del 20-30% e si assiste a normali modificazioni relative all'invecchiamento, in assenza di patologie renali; sulla base dei valori sierici di SDMA in soggetti sani, è stato supposto che eventuali variazioni renali da senescenza, rappresentano meno del 49% di diminuzione di GFR media di cani sani (Hall et al., 2016 a). Pedersen e collaboratori, in uno studio del 2006, hanno osservato una correlazione positiva tra le concentrazioni sieriche di SDMA e creatinina; tuttavia, tale associazione si annullava laddove la sCr era sostituita dal rapporto sCr/peso corporeo corretto. Hanno dedotto, quindi, che la SDMA ha un comportamento analogo alla sCr rispetto alla taglia del cane e risulta più elevata in cani di grossa mole, molto probabilmente perché essi hanno una capacità di filtrazione glomerulare inferiore alle taglie piccole (Pedersen et al., 2006). In veterinaria, il primo studio clinico sulla SDMA è stato condotto sulla specie felina; gli autori hanno rilevato una correlazione positiva tra le concentrazioni sieriche di SDMA e creatinina ($r=0,741$; $P<0,001$) in gatti con CKD ed ipertensione, evidenziando che, analogamente all'uomo, la SDMA viene escreto primariamente dal rene. Inoltre hanno rilevato un incremento, sia della SDMA che dell'ADMA, in

corso di CKD, che può essere responsabile della disfunzione delle cellule endoteliali renali (Jepson *et al.*, 2008).

Ciò conferma quanto già riportato nell'uomo, ovvero che entrambe le dimetil arginine inibiscono la sintesi dell'ossido di azoto (NO), da parte delle *endothelial Nitric Oxid Synthasis* (eNOS); l'NO ha un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi vascolare, attraverso una potente azione vasodilatatrice ed effetti anti-aterogenici ed anti-proliferativi sulle pareti vascolari (Franceschelli *et al.*, 2013). L'ADMA blocca in modo diretto l'azione delle eNOS, mentre la SDMA interferisce sulla loro attività indirettamente, attraverso un meccanismo "dose dipendente" ed in diversi modi: ostacolando l'*uptake* della L-arginina a livello delle cellule endoteliali glomerulari; promuovendo un disaccoppiamento dell'enzima eNOS, che riduce la produzione di NO e aumenta invece la sintesi di superossidi (Feliars *et al.*, 2015); ed, infine, impedendo il riassorbimento della L-arginina a livello dell'ansa di Henle dei tubuli renali (**Fig. 3.3**) (Veldink *et al.*, 2013). La sua attività, quindi, ridurrebbe la produzione di NO, conseguente alla ridotta biodisponibilità del suo precursore (Bode-Boger *et al.*, 2006).

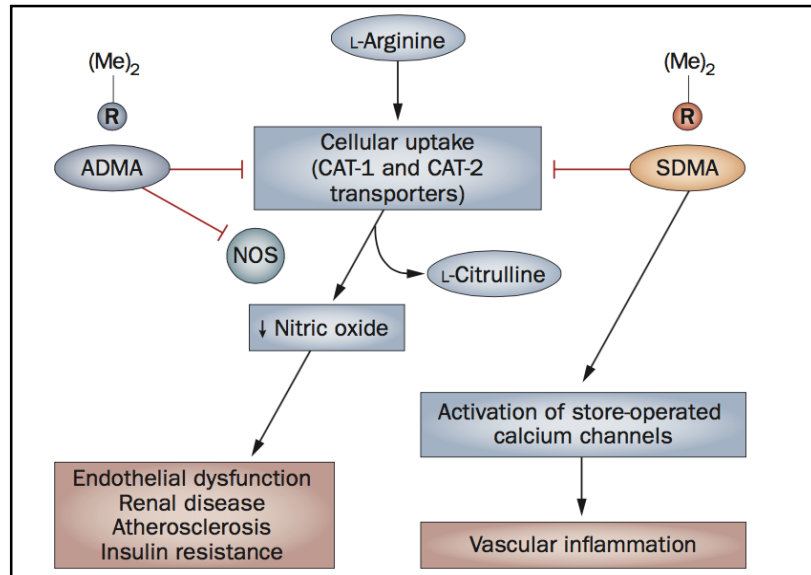


Fig. 3.3. Meccanismi fisiopatologici che evidenziano l'associazione tra i livelli sierici delle dimetilarginine e il danno vascolare/renale (Modificato da Schwedhelm e Böger 2011).

Le conseguenze vascolari sono rappresentate dall'aumento della PAS, dalla diminuzione del flusso plasmatico renale e concomitante innalzamento della resistività renale. Inoltre, nel corso di tali processi, si generano anioni superossidi, indici di stress ossidativo dell'endotelio glomerulare e l'esito globale è il danno endoteliale glomerulare con conseguente proteinuria (Jepson *et al.*, 2008; Franceschelli *et al.*, 2013; Feliers *et al.*, 2015). Successivamente, in uno studio comparativo sulle concentrazioni sieriche di SDMA e creatinina eseguito su gatti affetti da CKD, è stata dimostrata una relazione lineare anche tra la SDMA e la GFR: gli autori hanno concluso che la SDMA è un biomarker di CKD notevolmente più sensibile della creatinina sierica e che si correla in modo inversamente proporzionale alla GFR ($r = 0.79$) (Hall *et al.*, 2014 a). Braff e collaboratori hanno confermato lo stesso risultato, proponendo la SDMA come un ottimo surrogato della GFR nei gatti (Braff *et al.*, 2014). Inoltre, nonostante valutazioni seriali di sCr nello stesso soggetto aumentino la sensibilità nel rilevare cambiamenti nella GFR (Polzin, 2013), la SDMA si è rivelato essere meglio correlato anche in gatti geriatrici sani (Hall *et al.*, 2014 b). Di seguito (**Fig. 3.4**) sono sintetizzati i fattori che aumentano o diminuiscono la GFR e quelli che alterano i biomarker di funzionalità renale.

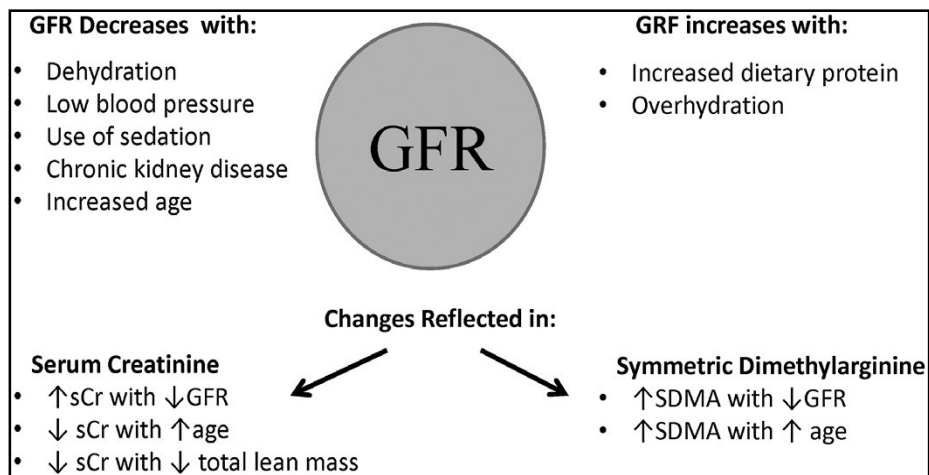


Fig. 3.4 Fattori che aumentano o diminuiscono la GFR e che alterano i biomarker di funzionalità renale (Modificato da Hall *et al.*, 2014 b).

Negli ultimi anni, anche nella specie canina, è stato dimostrato che le concentrazioni sieriche di SDMA sono inversamente proporzionali alla GFR. Tatematsu e collaboratori hanno dimostrato che in 10 cani, sottoposti a nefrectomia parziale o totale, le concentrazioni plasmatiche di SDMA aumentavano con la perdita di massa renale ed erano ben correlate con la GFR e con la sCr (Tatematsu *et al.*, 2007).

Più recentemente, è stato pubblicato uno studio prospettico condotto su una colonia di cani affetti da una nefropatia ereditaria progressiva (*progressive X-linked hereditary nephropathy – XLHN*) che raggiungevano l'*end stage* della malattia renale tra le 6 e le 18 settimane di vita, costituendo un modello ideale di una CKD rapida e progressiva. Gli autori, quindi, hanno valutato l'andamento nel tempo della SDMA, comparandolo con misurazioni seriali di sCr e GFR, e ne hanno validato il metodo di misurazione, ovvero la cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS) che ha dimostrato una performance analitica eccellente. Infine hanno verificato che la SDMA è altamente stabile in campioni di siero e plasma canini, resistendo a diverse temperature (dalla temperatura ambiente a quelle di refrigerazione) per 14 giorni. I loro risultati mostrano che i livelli sierici di SDMA aumentano con il progredire della patologia renale e si correlano fortemente sia con l'aumento della sCr sia con la riduzione della GFR (Nabity *et al.*, 2015).

Un simile risultato è stato ottenuto in uno studio eseguito su cani affetti da CKD, nei quali il valore soglia stabilito per la SDMA (vedi dopo) corrispondeva ad una riduzione di circa il 49% della GFR media, che coincideva a sua volta con uno stato di insufficienza renale cronica. Il valore più alto della sCr (nel cane 1,4 mg/dl), invece, coincideva con un decremento del 75% della GFR, rispetto ai valori medi. Quindi, in media, la SDMA rilevava una riduzione della GFR circa 9,8 mesi prima della creatinina, in cani con CKD (Hall *et al.*, 2016 b).

3.2.3 Dimetilarginina asimmetrica (ADMA): sintesi e metabolismo

L'ADMA ha una struttura molto simile all'arginina e pertanto compete con essa per il legame con la *endothelial Nitric Oxid Synthasis* (eNOS), enzima chiave nella formazione dell'ossido di azoto; una volta liberata nel citoplasma, l'ADMA viene sottoposta ad un ampio metabolismo (80%) attraverso un'idrolisi enzimatica operata da enzimi tessuto-specifici denominati *dimethylarginine dimethylaminohydrolase* (DDAH) che convertono la metilarginina in L-citrullina e dimetilamina; il restante 20 %

circa viene escreto con le urine (**Fig. 3.5**) (Kielstein *et al.*, 2006; Schwedhelm e Böger, 2011; Franceschelli *et al.*, 2013).

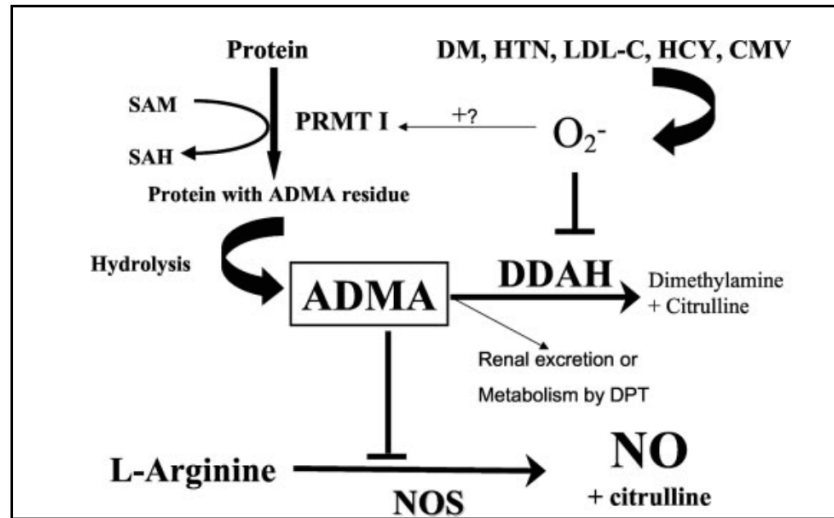


Fig. 3.5. Pathway biochimico di produzione, eliminazione e degradazione di ADMA (Modificato da Cooke, 2004).

Gli enzimi DDAH sono presenti in due isoforme, DDAH-1 e DDAH-2, ognuna delle quali ha una distribuzione tissutale specifica: la prima è predominante nei tubuli prossimali del rene e nel fegato, nei quali viene metabolizzato circa il 70% dell'ADMA; mentre l'isoforma DDAH-2 prevale nel sistema vascolare (es. cellule endoteliali e muscolatura liscia vasale) (Franceschelli *et al.*, 2013). Tali enzimi, quindi, bilanciano i livelli circolanti di ADMA, che fisiologicamente è presente in basse concentrazioni e non produce alcun effetto patologico. In seguito a processi di infiammazione o di stress ossidativo (es. colesterolo LDL ossidato, liberazione di citochine infiammatorie, iperomocisteinemia, iperglicemia e malattie infettive) viene compromessa la funzione degli enzimi DDAH e si assiste ad un incremento delle concentrazioni sieriche di ADMA; essa, attraverso un legame al sito catalico della eNOS, spiazzando l'arginina e riduce la produzione di ossido di azoto (Vallance e Leiper, 2004; Cooke, 2004; Xin *et al.*, 2007). La riduzione dell'NO circolante rappresenta un fattore prognostico negativo in pazienti affetti da patologie cardiovascolari, perché, come già descritto in precedenza, contribuisce alla genesi dell'aterosclerosi; in questo contesto, il dosaggio dell'ADMA

risulterebbe molto utile per evidenziare il grado di rischio di insorgenza di complicazioni cardiovascolari. E' nota infatti l'associazione tra l'aumento dei livelli sierici di ADMA e i principali fattori di rischio cardiovascolare, quali l'ipertensione, l'età, l'insulino-resistenza, il diabete, l'ipercolesterolemia etc. (Boger, 2003).

Il trasporto dell'ADMA (dal plasma ai siti di azione e di metabolismo) avviene tramite i trasportatori di aminoacidi cationici (*cationic aminoacid transporters*) CAT1 e CAT2; così come lo stoccaggio avviene principalmente all'interno degli eritrociti, che in seguito all'eritrocateresi, rilasciano importanti quote di ADMA libero (Franceschelli et al., 2013). Inoltre, analogamente alla SDMA, anche l'ADMA viene in parte trasformato nel α -keto-d-(N(G), N(G)-dimethyl- guanidine valeric acid, attraverso una reazione di transaminazione effettuata dall'enzima AGXT2 (*alanine-glyoxylate amino transferase 2*) a livello renale ed epatico (Franceschelli et al., 2013).

Tale via metabolica, riportata in medicina umana, è stata mutuata anche in campo veterinario (Hall et al., 2016 b; Relford et al., 2016) e, similmente a quanto descritto per l'isoforma simmetrica, l'ADMA risulta influenzata dalla taglia corporea del cane. In particolare, essa è correlata molto positivamente con il peso corporeo corretto per la percentuale di sottopeso/sovrappeso del soggetto. Dato l'importante ruolo che svolge nel controllo del tono vascolare, ne deriva una differente regolazione cardiovascolare tra i cani di piccola e grossa taglia (Pedersen et al., 2006).

3.2.4 Ruolo dell'ADMA nelle malattie cardiovascolari e nell'insufficienza renale

L'incremento dell'ADMA circolante può essere causato, come già in parte descritto, essenzialmente da tre condizioni: 1) uno squilibrio tra il repentino aumento delle sue concentrazioni e la velocità di eliminazione (pur funzionando correttamente tutte le vie di escrezione); 2) l'inibizione degli enzimi DDAH e 3) una compromissione renale con conseguente blocco della clearance urinaria di ADMA normalmente prodotta (Böger e Zoccali, 2003). Nell'ambito delle malattie cardiovascolari l'ADMA ha un importante significato predittivo dei rischi di complicazioni cardiovascolari come ad esempio l'aterosclerosi (Wilchen et al., 2007); per quanto riguarda, invece, la correlazione con l'insufficienza renale, in umana è stato dimostrato che la presenza di un danno renale riduce l'espressione e l'attività degli enzimi DDAH-1 a livello tubulare,

provocando un aumento delle concentrazioni sieriche di ADMA. Quando il danno è cronico, l'attività extrarenale delle DDAH-2 sembra essere *down-regolata* e quindi la degradazione dell'ADMA non è sufficiente; il risultato finale è un accumulo sierico della dimetilarginina, che raggiunge valori da 2 a 7 volte superiori alla norma in pazienti con insufficienza renale terminale (Vallance e Leiper, 2004; Schwedhelm e Böger, 2011; Hall *et al.*, 2014 a).

3.3 Metodiche di rilevamento della SDMA e dell'ADMA

Il gold standard per la misurazione della SDMA è la Cromatografia Liquida-Spettrometria di Massa (LC-MS) (Relford *et al.*, 2016). Nabity e collaboratori hanno validato la SDMA nel cane utilizzando tale tecnica analitica, caratterizzata da un'elevata performance e coefficienti di variabilità *intra-assay* ed *inter-assay* con un'accuratezza del 98% ed oltre (Nabity *et al.*, 2015).

Tuttavia, l'LC-MS può risultare un procedimento lungo e costoso, non sempre attuabile nella clinica di routine. E' stato quindi realizzato un nuovo metodo immunologico *high-throughput* che utilizza un coniugato della glucosio-6-fosfato deidrogenasi ed un anticorpo monoclonale anti-SDMA, per quantificare la SDMA nel siero o nel plasma (Relford *et al.*, 2016). Tale test risulta utile nell'analisi di molecole come la SDMA, che a causa delle loro dimensioni, hanno una scarsa capacità immunologica. E' una tecnica validata secondo l'*US Food and Drug Administration* e gli standard per il cane ed il gatto del *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI); l'accuratezza di questa tecnica è stata confermata comparandola con il gold standard della LC-MS (Relford *et al.*, 2016).

Analogamente l'ADMA può essere dosata con la metodica della Cromatografia Liquida/Spettrometria di Massa tandem (LC-MS/MS) (Martens-Lobenhoffer e Bode-Böger, 2003), in aggiunta a molte altre tecniche come ad es. l'HPLC (Chen *et al.*, 1997), e la gas-cromatografia/spettrometria di massa (GC/MS) (Tsikas *et al.*, 2003).

3.4 Intervalli di riferimento e specificità della SDMA e dell'ADMA nei piccoli animali

Al fine di utilizzare la SDMA come strumento di diagnosi precoce di insufficienza renale cronica, nel cane e nel gatto, sono stati stabiliti dei

range di riferimento seguendo le linee guida del *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) (Relford *et al.*, 2016).

In uno studio eseguito su 122 cani adulti sani, attraverso la LC-MS ed un'analisi non parametrica dei risultati, è stato definito che il valore di riferimento della SDMA deve essere inferiore o uguale a 14 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (**Fig. 3.6**).

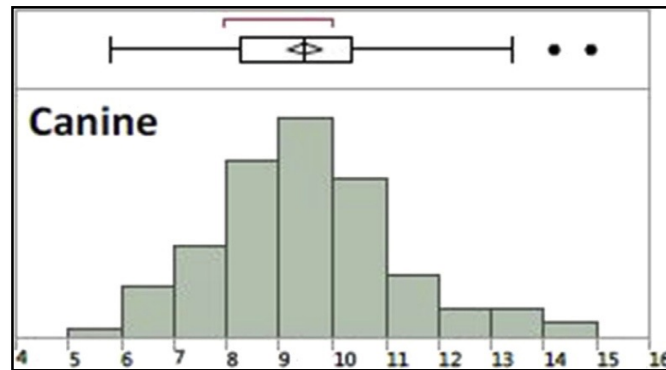


Fig. 3.6. Concentrazione sierica canina di SDMA (LC-MS) (mg/dL) tracciata sull'asse delle x , rispetto alla proporzione della popolazione di riferimento di cani adulti sani ($n=122$) sull'asse delle y (Rentko *et al.*, 2013).

In una ricerca effettuata su 86 gatti clinicamente sani, di diversa età e razza, è stato raggiunto lo stesso risultato, come riportato in **Fig. 3.7**.

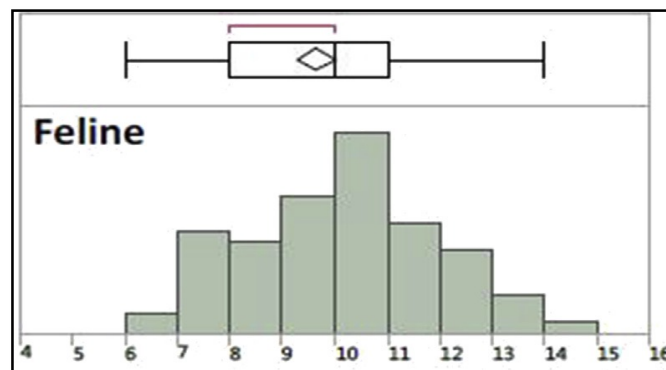


Fig. 3.7 Livelli di SDMA sierico felino, tracciati sull'asse delle x , in confronto con la popolazione di riferimento di gatti adulti sani ($n=86$) sull'asse delle y (Relford *et al.*, 2016).

La SDMA si è rivelato essere un biomarker endogeno di insufficienza renale cronica altamente specifico, perché diversi studi hanno provato la sua indipendenza da fattori extrarenali (Relford *et al.*, 2016). Nell'uomo i livelli sierici di SDMA non variano in corso di: risposte infiammatorie acute (Blackwell *et al.*, 2011), malattie cardiovascolari (Meinitzer *et al.*, 2011), diabete (Krzyzanowska *et al.*, 2007) e patologie epatiche (eccetto la sindrome epatorenale) (Mookerjee *et al.*, 2007), a meno che tali condizioni non siano accompagnate da un danno renale.

Nel cane, invece, è stato evidenziato che la SDMA non aumenta significativamente dopo un notevole esercizio fisico in cani da slitta, con valori di BUN normali, così come non è influenzato dal genere, dalla razza, da variazioni diurne e da somministrazioni per tempi brevi di ACE-inibitori (Moesgaard *et al.*, 2007; Hokamp e Nabity, 2016). In un gruppo di Cavalier King Charles Spaniels è stato evidenziato che la SDMA non è condizionata dall'età né dalla presenza di un rigurgito mitralico asintomatico (Pedersen *et al.*, 2006); infine, come già accennato, non vi è correlazione tra la SDMA e la massa magra totale sia nel cane (Hall *et al.*, 2015 a) che nel gatto (Hall *et al.*, 2014 b).

Per quanto riguarda l'ADMA, nella maggior parte degli studi di medicina umana, le sue concentrazioni plasmatiche sono comprese nel range di 0.22-0.88 $\mu\text{mol/L}$, a prescindere dalla metodica utilizzata (Matrozoza *et al.*, 2016; Sitar, 2016).

In veterinaria, i dati pubblicati relativi ai range di normalità di ADMA nel cane sono ancora esigui; tuttavia sono stati riportati valori minimi di 0,89 $\mu\text{mol/L}$ e massimi di 1,75 $\mu\text{mol/L}$ (Okubo *et al.*, 2005; Pedersen *et al.*, 2006; Jingjie *et al.*, 2012; Moesgaard *et al.*, 2012).

3.5 SDMA e stadiazione IRIS

La stadiazione IRIS, precedentemente riportata, tiene conto anche delle continue scoperte scientifiche che aggiungono ulteriori elementi all'algoritmo diagnostico della CKD. Infatti, nel 2016 è stata incorporata anche la SDMA come test precoce di insufficienza renale e complementare alla sCR.

Come mostrato in **Fig. 3.8**, un persistente aumento della SDMA (superiore al valore soglia di 14 $\mu\text{g/dl}$) indica una riduzione della funzionalità renale e classifica un cane o un gatto, con valori normali di creatinina (rispettivamente $<1.4 \text{ mg/dl}$ e $<1.6 \text{ mg/dl}$), nello stadio IRIS 1.

Nei pazienti classificati stadio 2, con uno scarso BCS, valori di SDMA superiori a ≥ 25 $\mu\text{g/dl}$ possono indicare che il grado di disfunzione renale è stato sottostimato. Infatti, come già descritto, a differenza della sCr, la SDMA non risulta essere influenzato dalla massa magra del soggetto e riflette, quindi, il reale avanzamento dell'insufficienza renale; per cui, tali pazienti andrebbero trattati come pazienti stadio 3. Analogamente, i pazienti stadio 3, con BCS scarso e valori di SDMA ≥ 45 $\mu\text{g/dl}$, dovrebbero essere trattati come pazienti di stadio 4. L'inclusione della SDMA nella classificazione IRIS rappresenta un dato preliminare e necessita di ulteriori studi su un numero maggiore di soggetti (<https://www.idexx.com>).





 Stage 1 No azotemia	 Stage 2 Mild	 Stage 3 Moderate	 Stage 4 Severe
<1.4	1.4–2.0	2.1–5.0	>5.0
<1.6	1.6–2.8	2.9–5.0	>5.0
>14	>14	Moderately increased	Markedly increased
	≥ 25		
		≥ 45	

Fig. 3.8. Classificazione IRIS 2015 aggiornata (<https://www.idexx.com>).

Quindi la SDMA consente di individuare, in anticipo rispetto alla sCr, un paziente (cane o gatto) nefropatico con segni clinici assenti o lievi, aumentando sia la probabilità di trattare precocemente le cause sottostanti di CKD sia di rallentare quanto prima la progressione della patologia, laddove non sia stata identificata l'eziologia (Relford *et al.*, 2016). La SDMA permette un monitoraggio migliore del calo ponderale, legato in particolare allo scadimento muscolare (Hall *et al.*, 2014 b; Hall *et al.*, 2015 a). Quest'ultimo, inoltre, può essere meglio valutato con un nuovo sistema, proposto dalla *World Small Animal Veterinary Association Global Nutrition Committee*, ovvero il *Muscle Condition Scoring* (MCS) che aiuta a rilevare una perdita di massa muscolare anche nei pazienti in sovrappeso (*WSAVA Nutritional Assessment Guidelines*, 2011).

In definitiva, la SDMA rappresenta un valido biomarker, specifico e sensibile, che affianca i parametri standard di funzionalità renale (sCr, azotemia ed esame completo delle urine) nell'obiettivo principale, ovvero una diagnosi precoce di CKD ed un efficace monitoraggio nel tempo (Relford *et al.*, 2016).

- Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG *et al.* Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework Biomarkers Definitions Working Group. *Clinical pharmacology & therapeutics* 2001; 69(3): 89-95.
- Bedford MT e Richard S. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Molecular Cell* 2005; 18:263–272.
- Blackwell S, O'Reilly DS, Reid D, *et al.* Plasma dimethylarginines during the acute inflammatory response. *European Journal of Clinical Investigation* 2011; 4:635–41.
- Bode-Boger SM, Scalera F, Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Breithardt G, Fobker M, and Reinecke H. Symmetrical Dimethylarginine: A New Combined Parameter for Renal Function and Extent of Coronary Artery Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 2006; 17: 1128-1130.
- Böger RH e Zoccali C. ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patient with end-stage renal disease. *Atherosclerosis Supplements* 2003; 4:23-28.
- Böger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. Review. *Cardiovascular Research* 2003; 59: 824-833.
- Braff J, Obare E, Yerramilli M, *et al.* Relationship between serum symmetric dimethylarginine concentration and glomerular filtration rate in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2014; 8:1699–701.
- Braun JP, Lefebvre HP, Watson ADJ. Creatinine in the Dog: A Review. *American Society for Veterinary Clinical Pathology* 2003; 32:162-179
- Chen GGBM, Xia LW, Zhao RQ. Determination of N, N - dimethylarginine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 1997; 692: 467-471.
- Cooke JP. Asymmetrical Dimethylarginine The Über Marker?. *Circulation* 2004; 109:1813-1819.
- Franceschelli S, Ferrone A, Pesce M, Riccioni G and Speranza L. Biological Functional Relevance of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Science* 2013; 14: 24412-24421.
- Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M and Jewell DE. Comparison of Serum Concentrations of Symmetric Dimethylarginine and Creatinine as Kidney Function Biomarkers in Cats with Chronic Kidney Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2014 a; 28:1676–1683.

- Hall JA, Yerramilli M, Obare E, *et al.* Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in healthy geriatric cats fed reduced protein foods enriched with fish oil, L-carnitine, and medium-chain triglycerides. *The Veterinary Journal* 2014 b; 202:588–96.
- Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Melendez LD and Jewell DE. Relationship between lean body mass and serum renal biomarkers in healthy dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2015 a; 29(3):808-14.
- Hall JA, MacLea Y J, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Schiefelbein H, Paetau-Robinson I, Jewell DE. Positive Impact of Nutritional Interventions on Serum Symmetric Dimethylarginine and Creatinine Concentrations in Client-Owned Geriatric Dogs. *PLoS One* 2016 a; 18;11(4): e0153653.
- Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Almes K, Jewell DE. Serum Concentrations of Symmetric Dimethylarginine and Creatinine in Dogs with Naturally Occurring Chronic Kidney Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2016 b; 30:794–802.
- Hokamp JA e Nabity MB. Renal biomarkers in domestic species. *Veterinary Clinical Pathology* 2016. 45 (1): 28–56.
- Jepson RE, Syme HM, Vallance C, *et al.* Plasma asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, l-arginine and nitrite/nitrate concentrations in cats with chronic kidney disease and hypertension. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2008; 22:317–24.
- Jingjie LI, Wei X, Wei F e Xiufen Q. Effects of Rosuvastatin on Serum Asymmetric Dimethylarginine Levels and Atrial Structural Remodeling in Atrial Fibrillation Dogs. *Pacing and Clinical Electrophysiology* 2012; 35:456–464.
- Kakimoto Y, Akazawa S. Isolation and identification of N-G, N-G- and N-G, N'- G-dimethyl-arginine, N-epsilon-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine. *The Journal of Biological Chemistry* 1970; 245:5751–8.
- Kielstein JT, Boger RH, Bode-Böger SM *et al.* Marked increase of asymmetric dimethylarginine in patients with incipient primary chronic renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 2002; 13: 170–176.
- Kielstein JT, Salpeter SR, Bode-Böger SM, Cooke JP and Fliser D. Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal

- function – a meta analysis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2006; 21:2445–51.
- Krzyzanowska K, Mittermayer F, Shnawa N, *et al.* Asymmetrical dimethylarginine is related to renal function, chronic inflammation and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes and albuminuria. *Diabetic Medicine* 2007; 24:81–6.
- Marescau B, Nagels G, Possemiers I, De Broe ME, Becaus I, Billiouw JM, Lornoy W, and De Deyn PP. Guanidino compounds in serum and urine of nondialyzed patients with chronic renal insufficiency. *Metabolism* 1997; 46:1024–31.
- Martens-Lobenhoffer J, Bode- Böger SM. Simultaneous detection of arginine, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and citrulline in human plasma and urine applying liquid chromatography-mass spectrometry with very straightforward sample preparation. *Journal of Chromatography B* 2003; 798: 231-239.
- Martens -Lobenhoffer J e Bode-Böger SM. Review Chromatographic-mass spectrometric methods for the quantification of l-arginine and its methylated metabolites in biological fluids. *Journal of Chromatography B* 2007; 851:30–41.
- Martens- Lobenhoffer J e Bode-Böger SM. Short communication Amino acid N-acetylation: Metabolic elimination of symmetric dimethylarginine as symmetric N_α-acetyldimethylarginine, determined in human plasma and urine by LC–MS/MS. *Journal of Chromatography B* 2015; 975: 59–64.
- Matrozova J, Vasilev V *et al.* Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) as a Marker of Endothelial Dysfunction in Primary Aldosteronism. *International Journal of Endocrinology and Metabolism* 2016; 14(4).
- McDermott JR. Studies on the catabolism of Ng-methylarginine, Ng, Ng-dimethylarginine and Ng, Ng-dimethylarginine in the rabbit. *The Biochemical Journal* 1976; 154: 179–184.
- Meinitzer A, Kielstein JT, Pilz S, *et al.* Symmetrical and asymmetrical dimethylarginine as predictors for mortality in patients referred for coronary angiography: the Ludwigshafen risk and cardiovascular health study. *Clinical Chemistry* 2011; 57: 112–21.
- Moesgaard SG, Holte AV, Mogensen T, *et al.* Effects of breed, gender, exercise and white-coat effect on markers of endothelial function in dogs. *Research in Veterinary Science* 2007; 82:409–15.
- Moesgaard SG, Klostergaard C, Zois NE *et al.* Flow-Mediated Vasodilation Measurements in Cavalier King Charles Spaniels with

- Increasing Severity of Myxomatous Mitral Valve Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2012; 26:61–68.
- Mookerjee RP, Malaki M, Davies NA, *et al.* Increasing dimethylarginine levels are associated with adverse clinical outcome in severe alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2007; 45:62–71.
- Nabity MB, Lees GE, Boggess MM, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Rakitin A, Aguiar J and Relford R. Symmetric Dimethylarginine Assay Validation, Stability, and Evaluation as a Marker for the Early Detection of Chronic Kidney Disease in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2015; 29(4):1036–44.
- Okubo K, Hayashi K, Wakino S, Matsuda H, Kubota E, Honda M, Tokuyama H, Yamamoto T, Kajiya F e Saruta T. Role of Asymmetrical Dimethylarginine in Renal Microvascular Endothelial Dysfunction in Chronic Renal Failure with Hypertension. *Hypertension Research* 2005; 28: 181–189
- Pedersen LG, Tarnow I, Olsen LH, Teerlink T, Pedersen HD. Body size, but neither age nor asymptomatic mitral regurgitation, influences plasma concentrations of dimethylarginines in dogs. *Research in Veterinary Science* 2006; 80: 336–342.
- Polzin DJ. Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney disease in dogs and cats. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2013; 23:205–215.
- Pressler BM. Clinical approach to advanced renal function testing in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2015; 43:1193–208.
- Puntmann VO. How-to guide on biomarkers: biomarker definitions, validation and applications with examples from cardiovascular disease. *Postgraduate Medical Journal* 2009; 85:538–45.
- Relford R, Robertson J, Clements C. Symmetric Dimethylarginine Improving the Diagnosis and Staging of Chronic Kidney Disease in Small Animals. *Veterinary Clinic of Small Animals* 2016; 46: 941–960.
- Rentko V, Nabity M, Yerramilli M, *et al.* Determination of serum symmetric dimethylarginine reference limit in clinically healthy dogs [ACVIM abstract P-7]. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2013; 27:750.
- Schwedhelm E e Böger RH. The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease. *Nature Reviews Nephrology* 2011; 7:275–85.

- Schwedhelm E, Xanthakis V, Maas R, Sullivan LM *et al.* Plasma symmetric dimethylarginine reference limits from the Framingham Offspring Cohort. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(11): 1907–1910.
- Sitar ME. Asymmetric Dimethylarginine and Its Relation As a Biomarker in Nephrologic Diseases *Biomark Insights* 2016; 11: 131–137.
- Tatematsu S, Wakino S, Kanda T, *et al.* Role of nitric oxide-producing and -de- grading pathways in coronary endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 2007; 18:741–9.
- Tsikas D, Schubert B, Gutzki FM, Sandmann J, Frölich JC. Quantitative determination of circulating and urinary asymmetric dimethylarginine (ADMA) in humans by gas chromatography-tandem mass spectrometry as methyl ester tri (N- pentafluoropropionyl) derivative. *Journal of Chromatography B* 2003; 798: 89-99.
- Vallance P e Leiper J. Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine: Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2004; 24:1023-1030.
- Vallance P, Leone A, Calver A, *et al.* Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992; 339:572–5.
- Veldink H, Faulhaber-Walter R, Park JK, Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger S, Schuett H, Haghighi A, Hilfiker-Kleiner D and Kielstein JT. Effects of chronic SDMA infusion on glomerular filtration rate, blood pressure, myocardial function and renal histology in C57BL6/J mice. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28: 1434–1439.
- Von Hendy-Willson VE, Pressler BM. An overview of glomerular filtration rate testing in dogs and cats. *Veterinary Journal* 2011; 188:156–165.
- Wilchen DEL, Sim AS, Wang J, Wang XL. Asymmetric dimethyl arginine (ADMA) in vascular, renal and hepatic disease and the regulatory role of L-arginine on its metabolism. *Molecular and Genetics Metabolism* 2007; 91 :309-317.
- WSAVA Nutritional Assessment Guidelines Task Force Members, Freeman L, Becarova I, Cave N, *et al.* WSAVA Nutritional Assessment Guidelines. *JournANI of Small Animal Practice* 2011; 52:385–96.
- Xin HY, Jiang DJ, Jia SJ, Song K, Wang GP, Li YJ, Chen FP. Regulation by DDAH/ADMA pathway of lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in endothelial cells. *Thrombosis and Haemostasis* 2007; 97: 830-838.

Capitolo 4

Sindrome cardio-renale nell'uomo

4.1 Sindrome Cardio-Renale nell'uomo

La Sindrome Cardio-Renale (SCR) rappresenta nell'uomo un ampio gruppo di “patologie del cuore e del rene, in cui la disfunzione acuta o cronica di uno dei due organi induce una disfunzione acuta o cronica nell'altro”. Tale definizione, enunciata nel 2010 dalla *Consensus Conference della Acute Dialysis Quality Initiative Group*, ha dato forma ad un concetto già in uso in medicina umana, ma ancora privo di una precisa definizione e classificazione (Di Lullo *et al.*, 2013). Successivamente, studi sull'argomento hanno trasformato il concetto di unica patologia in un più ampio gruppo di sindromi, individuando 5 sottotipi di Sindromi Cardio-Renali (**Tab. 4.1**), al fine di attuare metodologie più corrette e mirate, in termini di prevenzione e terapia (Quintavalla, 2011).

Tab. 4.1. Classificazione delle Sindromi Cardio-Renali (Modificata da Di Lullo et al., 2013) IRA: insufficienza renale acuta; IRC: insufficienza renale cronica

Tipo	Denominazione	Descrizione	Esempio
1	Cardio-renale acuta	Insufficienza cardiaca acuta che conduce ad IRA	Sindrome coronarica acuta che porta a scompenso cardiaco acuto ed insufficienza renale
2	Cardio-renale cronica	Scompenso cardiaco cronico che conduce ad insufficienza renale	Scompenso cardiaco cronico
3	Nefrocardiaca acuta	IRA che conduce ad insufficienza cardiaca acuta	Cardiomiopatia uremica secondaria ad IRA
4	Nefrocardiaca cronica	IRC che conduce ad insufficienza cardiaca	Ipertrofia ventricolare sinistra e scompenso cardiaco diastolico secondari ad insufficienza renale
5	Secondaria	Patologie sistemiche che comportano insufficienza cardiaca e renale	Shock settico, vasculiti, diabete mellito

4.2 Definizione ed eziologia delle sindromi cardio-renali

4.2.1 Sindrome Cardio-Renale Tipo 1

La Sindrome Cardio-Renale tipo 1 è definita come una sindrome tipicamente acuta in cui un peggioramento improvviso della funzione cardiaca porta, in un arco di tempo variabile, ad un deficit acuto della funzione renale (Erena *et al.*, 2012; Di Lullo *et al.*, 2013). E' una patologia con elevata incidenza nei pazienti umani ospedalizzati per insufficienza cardiaca acuta scompensata (*Acute Decompensated Heart Failure*, ADHF) o per Sindrome Coronarica Acuta (*Acute Coronary Syndrome*, ACS), che conducono ad un peggioramento acuto della funzionalità renale (*Worsening Renal Function*, WRF) (Bagshaw *et al.*, 2010).

Nella fisiopatologia della SCR tipo 1 giocano un ruolo fondamentale numerosi meccanismi (**Fig. 4.1**): i primi sono di tipo emodinamico e si caratterizzano per una riduzione della gittata cardiaca che induce un progressivo decremento del flusso ematico renale (*Renal Blood Flow*, RBF) e della *estimated Glomerular Filtration Rate* (eGFR) (Di Lullo *et al.*, 2013); tale evento, rappresenta generalmente un meccanismo reversibile e si associa a fenomeni compensatori finalizzati al ripristino di condizioni emodinamiche standard (Hanada *et al.*, 2012).

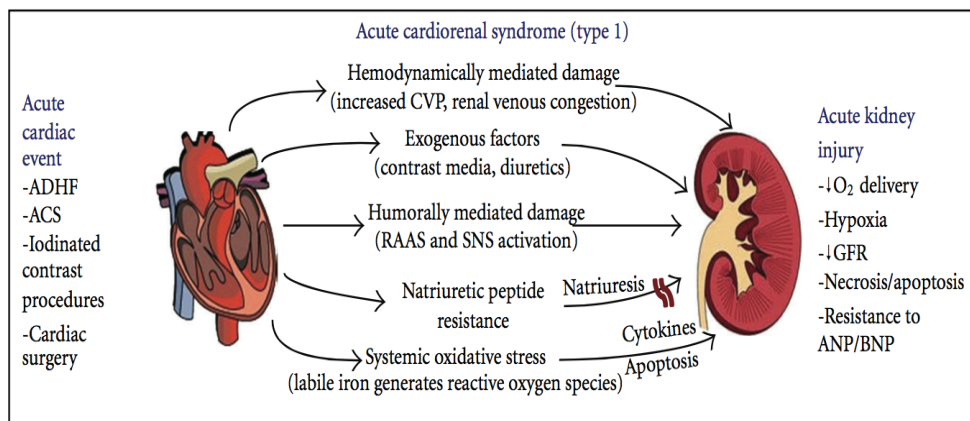


Fig. 4.1. Sindrome Cardio-renale tipo 1 (Modificato da McCullough, 2011).

Alla base di tali meccanismi compensatori vi è l'attivazione di risposte neuroendocrine ed ormonali da parte dell'organismo; infatti, si assiste, da un lato all'attivazione del sistema nervoso simpatico (SNS), che aumenta la resistenza dell'arteriola renale afferente, riducendo l'RBF e la GFR e, dall'altro, all'attivazione del sistema RAAS (Braam, 2012; Di Lullo *et al.*, 2013). Il risultato finale è un'importante vasocostrizione periferica ed intra-renale, che determina un danno renale inizialmente reversibile e poi, progressivamente, irreversibile (Ronco *et al.*, 2008; Hanada *et al.*, 2012).

La progressione ed il peggioramento della SCR tipo 1 può essere anche associato all'utilizzo di farmaci potenzialmente nefrotossici, comunemente somministrati in pazienti con insufficienza cardiaca; ad esempio, l'associazione di ACE-inibitori ed antagonisti recettoriali dell'angiotensina II (sartani) si rende responsabile di una disfunzione tubulare, specialmente in pazienti cardiopatici già affetti da malattia renale cronica (Di Lullo *et al.*, 2013).

Alla base della SCR tipo 1 vi sono anche altri processi fisiopatologici come lo sviluppo di un notevole stress ossidativo dovuto alla produzione di Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), che avviene attraverso un articolato meccanismo ben descritto da McCullough (2011); oppure una tipica "anemia cardio-renale" causata sia dall'insufficienza cardiaca, in cui il persistente stato infiammatorio riduce la sensibilità all'azione dell'eritropoietina da parte delle cellule ematiche, sia dall'insufficienza renale che comporta una ridotta sintesi di EPO. La riduzione della concentrazione di tale ormone si associa alla perdita di tutti i relativi effetti benefici, come la prevenzione dell'apoptosi delle cellule cardiache e renali (Bock e Gottlieb, 2010).

Infine è stato dimostrato che nei pazienti affetti da SCR tipo 1 aumenta il rischio di mortalità e i tempi di ospedalizzazione; infatti tali soggetti, spesso, sono affetti da una condizione di CKD preesistente che contribuisce allo sviluppo di un danno renale acuto (McCullough, 2011) e anche piccoli incrementi della sCr (0,3 mg/dl) possono influenzare il rischio di morte (Jose *et al.*, 2006; Ronco *et al.*, 2010).

4.2.2 Sindrome Cardio-Renale Tipo 2

La SCR di tipo 2 si caratterizza per la presenza di uno scompenso cardiaco cronico che, con tempi interindividuali variabili, conduce alla malattia renale cronica. Spesso il coinvolgimento cardiaco e renale coesistono in partenza, così come non è sempre semplice stabilire il *primum movens*

The diagram illustrates the pathogenesis of chronic heart disease and chronic kidney disease (CKD) through a cycle of mutual exacerbation. On the left, a heart is shown with arrows pointing to various clinical and physiological factors. On the right, three stages of kidney development are shown, with arrows indicating the progression from normal to diseased states.

Chronic heart disease is associated with the following factors:

- Anemia
- Na + H₂O retention
- Uremic solute retention
- Ca and Phos abnormalities
- Hypertension
- Genetic risk factors
- Acquired risk factors
- low cardiac output (CO)
- Low cardiac output (CO)
- Subclinical inflammation
- Endothelial dysfunction
- Accelerated atherosclerosis
- Chronic hypoperfusion
- Increased renal vascular resistance
- Increased venous pressure
- Embolism

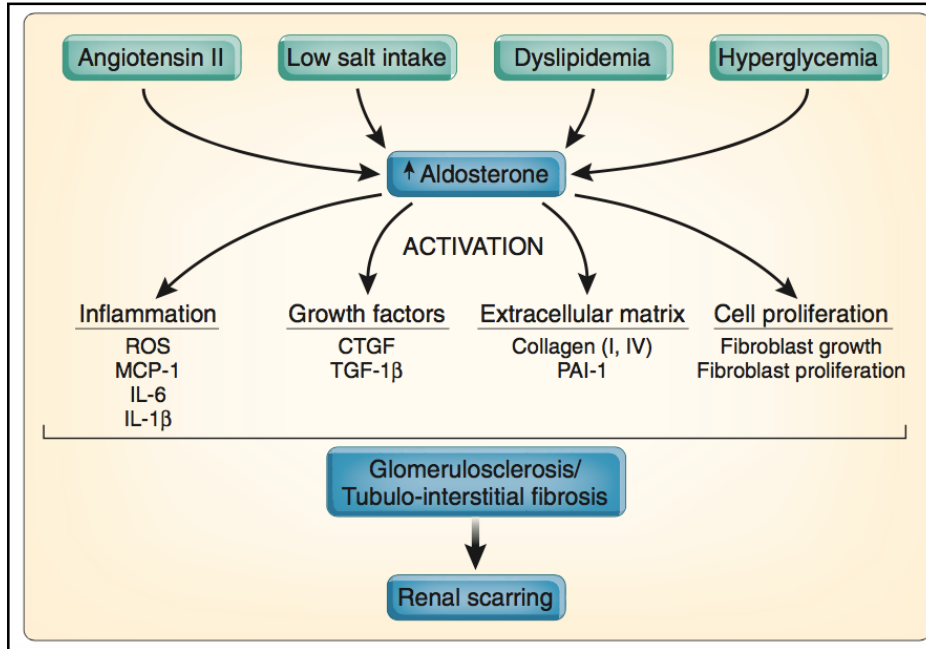
Increased susceptibility to insults leads to **Chronic hypoperfusion** and **Apoptosis**, which results in **Insult and initiation of kidney damage**. This stage is characterized by **Sclerosis - Fibrosis**, leading to the **Progression of CKD**.

The progression of CKD is associated with the following factors:

- Anemia, hypoxia
- RAA and sympathetic activation
- Na + H₂O retention
- Ca and Phos abnormalities
- Hypertension, LVH
- Anemia
- Na + H₂O retention
- Uremic solute retention
- Ca and Phos abnormalities
- Hypertension

I meccanismi suddetti contribuiscono, in modo diverso, alla progressione della CKD: la sintesi di angiotensina II e di aldosterone determinano un

aumento del riassorbimento di sodio con conseguente sovraccarico di volume e di pressione (Di Lullo *et al.*, 2013); gli aumentati livelli di aldosterone, inoltre, contribuiscono alla genesi della fibrosi glomerulare attraverso la produzione del *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), di fibronectina e di molti altri mediatori come illustrato nella **Fig. 4.3**.



*Fig.4.3 I meccanismi multipli che spiegano i potenziali effetti nocivi dell'aldosterone sul rene. L'aldosterone promuove una fibrosi tubulo-interstiziale ed una cosiddetta "cicatrice renale" (renal scarring). CTGF, connective tissue growth factors; ROS, reactive oxygen species; PAI-1, plasminogen activator inhibitor 1; MCP-1, membrane cofactor protein 1 (Modificato da Remuzzi *et al.*, 2008).*

La SCR tipo 2 sembra avere un'incidenza del 63% nei pazienti ospedalizzati con insufficienza cardiaca congestizia (CHF) e può essere associata ad un *outcome* negativo, se correlata a progressivo peggioramento della funzione renale; infatti, in uno studio condotto su 1102 pazienti con CHF, più del 50% era affetto da disfunzione renale e il 9% aveva riduzione della GFR (Ronco *et al.*, 2010). Infine, i pazienti con SCR tipo 2 possono essere sottoposti a ripetute ospedalizzazioni, a causa di riacutizzazioni cicliche della malattia renale cronica o cardiaca che esita in un progressivo peggioramento della sindrome (Di Lullo *et al.*, 2013).

4.2.3 Sindrome Cardio-Renale Tipo 3

La SCR tipo 3 apre il capitolo delle sindromi in cui è il danno renale a scatenare, o a peggiorare, la patologia cardiaca; in particolare, una condizione di insufficienza renale acuta conduce alla genesi di un danno cardiaco acuto (Di Lullo *et al.*, 2013). Attualmente il termine di *Acute Renal Failure* (ARF) è stato sostituito con quello più appropriato di *Acute Kidney Injury* (AKI), ovvero un insulto renale acuto, al fine di sottolineare che peggioramenti o insufficienze improvvisi della funzionalità renale sono spesso secondari ad insulti (di diversa natura), responsabili di cambiamenti strutturali e funzionali del rene (Mehta *et al.*, 2007).

I meccanismi eziopatogenetici della SCR tipo 3 sono di tipo diretto ed indiretto, semplificati nella **Fig. 4.4**. Tra i primi, giocano un ruolo significativo i cosiddetti connettori cardio-renali, descritti ampiamente da Bongartz nel 2005 e che sono: il sistema immunitario, il SNS, il sistema RAAS, l'equilibrio tra l'ossido di azoto (NO) e i ROS ed infine l'attivazione della cascata della coagulazione (Bongartz *et al.*, 2005; Di Lullo *et al.*, 2013).

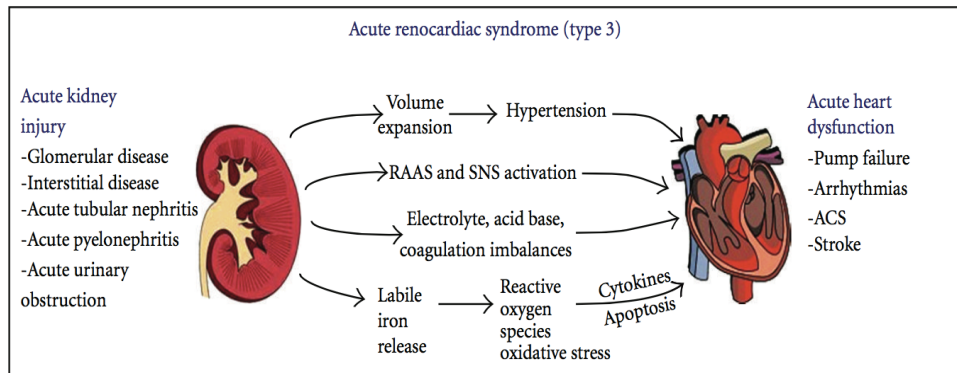


Fig. 4.4. Sindrome Cardio-renale Tipo 3 (Modificato da McCullough, 2011).

La risposta immunitaria, che si attiva in corso di AKI, è caratterizzata dalla secrezione di mediatori ad azione pro e anti-infiammatoria, da modificazioni morfo-funzionali delle cellule immunocompetenti e dall'incremento di citochine (TNF α , interleuchina-1 ed interleuchina-6) che esercitano effetti diretti a carico dei miocardiociti alterandone le proprietà contrattili (Prabhu, 2004). Tali citochine, inoltre, hanno una vera e propria azione cardiotossica, come dimostrato dalla riduzione della

frazione d'eiezione ventricolare sinistra e dall'aumento dei volumi telediastolici e telesistolici del ventricolo sinistro; a ciò si associa anche un deficit della funzione diastolica, testimoniato da un pattern ecocardiografico da alterato rilasciamento (Di Lullo *et al.*, 2013).

Altri processi rilevanti, di tipo diretto, sono l'iperattività dei sistemi SNS e RAAS, interconnessi tra di loro. L'SNS, infatti, agisce sia sul miocardio, attraverso una secrezione anomala di noradrenalina e provocando alterazioni del metabolismo del calcio e fenomeni di apoptosi cellulare (Di Lullo *et al.*, 2013); sia sui recettori β 1-adrenergici presenti a livello dell'apparato iuxtaglomerulare, che a loro volta attivano il RAAS. Quest'ultimo viene fortemente stimolato e gli effetti che ne derivano sono molteplici: una vasocostrizione sistemica, un aumento delle resistenze vascolari, l'apoptosi dei cardiomiociti ed un rimodellamento del ventricolo sinistro in senso ipertrofico. E' comprensibile, quindi, che l'elevata percentuale di cellule miocardiche apoptotiche contribuisce al verificarsi di eventi cardiovascolari letali in corso di danno renale acuto (Di Lullo *et al.*, 2013).

Tra i meccanismi fisiopatologici indiretti ci sono alterazioni emodinamiche costituite principalmente dal sovraccarico di volume, con conseguente aumento del precarico (Grams e Rabb, 2012); ciò è causato dalla ritenzione di sodio e di acqua (indotta dall'attivazione del RAAS) e da potenziali condizioni di oliguria-anuria (indotta dall'AKI). Nei pazienti ricoverati in terapia intensiva, la presenza di un sovraccarico di volume si correla con una prognosi infausta in quanto la ritenzione di liquidi può indurre aritmie fatali, ipertrofia ventricolare sinistra e fibrosi miocardica; così come, si può instaurare una condizione di ipertensione arteriosa e fenomeni di natura ischemica (Davis *et al.*, 2000; Di Lullo *et al.*, 2013). In corso di AKI, è tipica una condizione di acidosi metabolica che, agendo a livello dei recettori β -adrenergici e modificando la concentrazione di calcio intracellulare, concorre ad alterare la contrattilità miocardica; in particolare l'acidosi diminuisce la forza di contrazione del muscolo miocardico in risposta alla noradrenalina (Nimmo *et al.*, 1993).

Ultime, ma non per importanza, sono le alterazioni elettrolitiche come l'iperpotassiemia e l'iperfosfatemia che alterano i potenziali di membrana dei cardiomiociti, contribuendo all'insorgenza di aritmie cardiache (onde T prominenti o *tenting*, sopraslivellamento del tratto S-T, etc.) (Di Lullo *et al.*, 2013; Bagshaw *et al.*, 2013).

4.2.4 Sindrome Cardio-Renale tipo 4

La SCR tipo 4, detta anche sindrome reno-cardiaca cronica, comprende tutte le patologie cardiache secondarie ad una condizione di malattia renale cronica, indipendentemente dallo stadio di malattia renale definito dalla stadiazione *National Kidney Foundation* (NKF) (Di Lullo *et al.*, 2013). Nei pazienti affetti da questa sindrome il danno renale costituisce un fattore di rischio indipendente di morbidità e mortalità cardiovascolare (**Fig. 4.5**) infatti, in corso di CKD, vi è un elevato rischio di sviluppare una malattia coronarica su base aterosclerotica, calcificazioni coronariche e miocardiche (dovute all'iperparatiroidismo secondario ed alle alterazioni del metabolismo calcio-fosforo) (McCullough *et al.*, 2008) ed ipertrofia ventricolare sinistra (IVS). Quest'ultima è il principale indicatore di SCR tipo 4 e scaturisce da diversi fattori: l'azione diretta di alcune tossine uremiche sul miocardio; l'ipertensione arteriosa ed aterosclerosi che inducono direttamente l'ipertrofia dei cardiomiociti, con conseguente aumento della massa ventricolare sinistra e dello spessore della parete ventricolare; ed infine il sovraccarico di volume provocato dalla ritenzione idrosalina (Di Lullo *et al.*, 2013). La persistente ipertrofia miocardica può determinare la progressiva obliterazione delle lacune vascolari, cui si associa la mancata capacità dei capillari di assecondare tale condizione ipertrofica (*myocyte/capillary mismatch*) rendendo i pazienti suscettibili di patologie cardiache su base ischemica (Amann *et al.*, 1998).

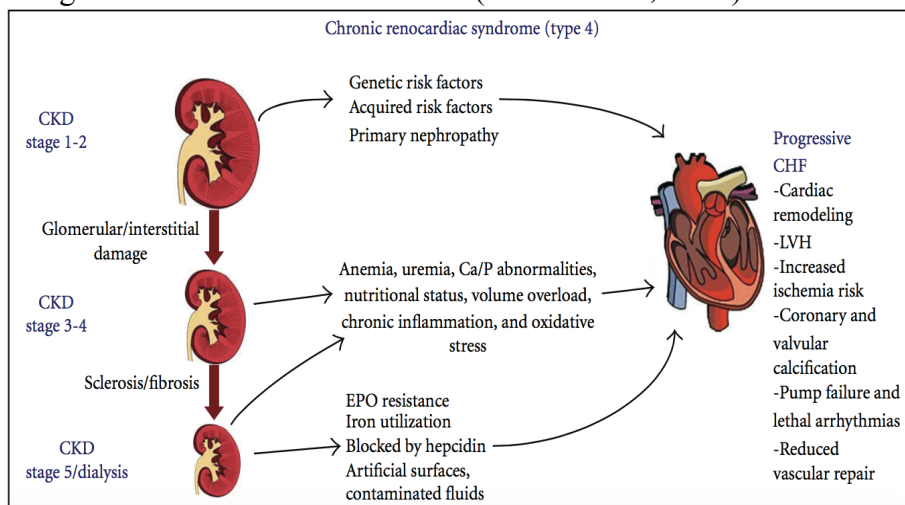


Fig. 4.5. Sindrome Cardio-renale tipo 4 (Modificato da McCullough, 2011).

4.2.5 Sindrome cardio-renale tipo 5

Quest'ultima sindrome, definita anche Sindrome cardio-renale secondaria (**Fig. 4.6**), comprende un insieme di condizioni sistemiche che portano ad un danno simultaneo dell'apparato cardiovascolare e del rene, in modo acuto e/o cronico (Ronco *et al.*, 2010). Essa può esordire improvvisamente in corso di shock settico/sepsi, intossicazioni da farmaci e/o da droghe pesanti e malattie autoimmunitarie (Lupus eritematoso sistemico, Granulomatosi di Wegener e Sarcoidosi), presentando una notevole variabilità nei tempi d'insorgenza; una volta comparsa, induce effetti devastanti sulle funzionalità cardiaca e renale (Di Lullo *et al.*, 2013).

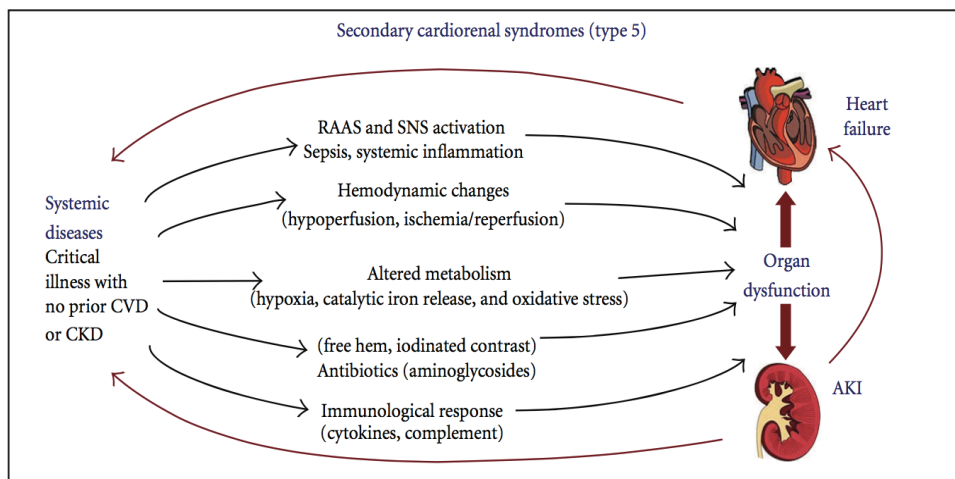


Fig. 4.6. Sindrome Cardio-renale tipo 5 (Modificato da McCullough, 2011)

Negli stadi iniziali di un processo settico, il primo distretto ad essere coinvolto è quello microcircolatorio: condizioni di shock distributivo, disfunzione endoteliale, adesione leucocitaria e microtrombi conducono ad un'alterata perfusione locale (Trzeciak *et al.*, 2007); successivamente, vi può essere coinvolgimento cardiaco (cardiopatia settica) caratterizzato da dilatazione biventricolare e caduta della frazione di eiezione ventricolare con conseguente riduzione della gittata cardiaca, spesso refrattaria a trattamenti terapeutici con amine vasoattive (Di Lullo *et al.*, 2013).

A livello renale si assiste principalmente ad alterazioni della vascularizzazione intra-parenchimale (es. aumento delle resistenze vascolari), all'attivazione del RAAS che tenta di mantenere costante la

pressione arteriosa e, soprattutto, allo sviluppo d'insufficienza renale acuta. Questa, non solo viene peggiorata dalla ridotta gittata cardiaca, ma può evolvere in CKD e compromettere, a sua volta, la contrattilità cardiaca a causa dell'acidosi metabolica (Di Lullo *et al.*, 2013).

La SCR tipo 5 può essere anche la risultante di una o più patologie sistemiche croniche rappresentando, in tal caso, un evento insidioso che conduce ad un progressivo scompenso cardio-renale. In questa fase, il cuore ed il rene mettono in atto risposte adattative che falliscono nel lungo periodo, fino ad arrivare alla disfunzione di uno dei due organi, con la possibilità che l'evento mal adattativo di un organo preceda nettamente quello dell'altro (Di Lullo *et al.*, 2013).

Nel 2013, è stata proposta una classificazione alternativa per la sindrome cardio-renale che individua 7 tipologie di pazienti, in base alla loro manifestazione clinica prevalente: tipologia “emodinamica”, “uremica”, “vascolare”, “neuromorale”, da “anemia e/o metabolismo del ferro”, “metabolismo minerale” e “malnutrizione-infiammazione-cachessia” (Hatamizadeh *et al.*, 2013; Obi *et al.*, 2016) (**Fig. 4.7**).

Table 1 Proposed CRS classification based on putative pathophysiology and clinical applicability at time of patient evaluation		
CRS category	Definition	Comments
1) Haemodynamic	Haemodynamic compromise is the major clinical manifestation	Can be subclassified as acute (1a) or chronic (1b)
2) Uraemic	Uraemic manifestations are the most prominent clinical appearances	Can be subclassified as acute (2a) or chronic (2b)
3) Vascular	Cardiovascular and/or renovascular manifestations are the most prominent clinical findings	Can be subclassified as acute (3a) or chronic (3b) and as atherosclerotic (as), thromboembolic (te) or endothelial dysfunction (ed)
4) Neurohumoral	Electrolyte disorders, acid-base disorders or dysautonomia is the most prominent finding	Can be subcategorized into acute (4a) or chronic (4b) and into electrolyte (el), acid-base (ab) or autonomic dysregulation (ad)
5) Anaemia and/or iron metabolism	Anaemia and/or iron metabolism dysregulation are the most prominent clinical manifestations	Can be subcategorized into acute (5a) or chronic (5b)
6) Mineral metabolism	Dysregulation of calcium and phosphorus and their regulators including vitamin D and FGF23 are the most prominent clinical manifestations	This category is mostly chronic by nature
7) Malnutrition–inflammation–cachexia	Malnutrition, cachexia and inflammatory state is the most prominent clinical manifestation	This category is mostly chronic by nature

Fig. 4.7. Proposta di classificazione per la SCR (Modificato da Hatamizadeh *et al.*, 2013)

Tale classificazione, secondo gli autori, offre un approccio sistematico alle Sindromi Cardio-Renali nell'uomo migliorandone la comprensione eziologica e aiutando il clinico a selezionare strategie terapeutiche ottimali; infatti è una stadiazione in cui la categoria di ogni paziente può variare con il tempo e dipende dall'ultima valutazione clinica.

4.3 Diagnosi della Sindrome Cardio-Renale nell'uomo

Il ruolo dei biomarker e delle tecniche di *imaging*, nell'ambito delle diverse sindromi cardiorenali nell'uomo, è stato ampiamente studiato da diversi autori nel corso degli anni, nel tentativo di formulare una diagnosi precoce e ottenere migliori prospettive prognostiche e terapeutiche (Ronco *et al.*, 2010; Brisco e Testani, 2014). La diagnostica per immagini, per tutti i tipi di SCR, è rappresentata principalmente dall'ecografia renale e dall'ecocardiografia trans-toracica; tali tecniche potenziano e raffinano la capacità di quantificare il danno renale, costituendo un metodo diagnostico complementare ai principali indicatori di sindrome cardio-renale, quali sono i biomarker di laboratorio (Ronco *et al.*, 2010; Di Lullo *et al.*, 2013).

4.4 Principali Biomarker di SCR nell'uomo

4.4.1 Brain Natriuretic Peptide

I primi biomarker di SCR nell'uomo sono rappresentati dal peptide natriuretico cerebrale (*Brain Natriuretic Peptide*, BNP) e dal frammento N-terminale del BNP (NT-pro BNP) che, ormai, sono considerati importanti strumenti diagnostici in corso di insufficienza cardiaca acuta scompensata (ADHF) (Maisel *et al.*, 2004). Essi sono poliaminoacidi con attività ormonale, sintetizzati, nel caso specifico del BNP e NT-pro BNP, a livello cerebrale; vengono immagazzinati nei cardiomiociti (atriali e ventricolari) e poi, in risposta allo *stretch* ventricolare o a condizioni di ipertrofia miocardica, sono rilasciati nel circolo sotto forma attiva (BNP) e inattiva, ma più stabile (NT-pro BNP). Una delle loro principali attività biologiche è quella di favorire la diuresi e la vasodilatazione, contrastando così l'attivazione del RAAS (Borgarelli *et al.*, 2012 b).

Il BNP e il NT-pro BNP risultano particolarmente elevati nei pazienti affetti da SCR tipo 1; tuttavia, avendo mostrato una validità nei diversi stadi di CKD (Austin *et al.*, 2006), essi sono potenziali indicatori anche di altre sindromi (tipo 2 e 4). Uno studio eseguito su 720 pazienti affetti da ADHF e da disfunzione renale (RD), ha dimostrato che l'aumento in particolare di NT-pro BNP, sopra i valori medi, non riflette semplicemente una riduzione nella GFR, ma costituisce un'importante caratteristica della disfunzione renale in corso di insufficienza cardiaca. Infatti, l'aumento del NT-pro BNP si correla sia con la diminuzione di GFR che con l'aumento della creatinina (>0,3 mg/dl) e, a parità di disfunzione renale, elevati livelli

del peptide rappresentano un elemento differenziale di una sindrome cardio-renale; il tutto si correla significativamente con un'elevata mortalità (Van Kimmenade *et al.*, 2006; Brisco e Testani, 2014).

4.4.2 *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)*

La *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*, conosciuta anche come lipocalina-2, è una piccola proteina (25 kDa) originariamente ritrovata nei granuli all'interno dei neutrofili, che aumenta (sia a livello sierico che urinario) in corso di processi infiammatori, di insulto renale e nei pazienti con insufficienza cardiaca cronica (Brisco e Testani, 2014). Normalmente essa viene filtrata nel glomerulo e poi quasi del tutto riassorbita nel tubulo convoluto prossimale, condizione che viene a mancare in corso di AKI; infatti è possibile rilevare un picco sierico ed urinario di NGAL nelle successive 24-48 ore dall'insulto renale. Per queste caratteristiche è considerato un biomarker di danno acuto tubulare di origine tossica, infettiva o ischemica (Mishra *et al.*, 2003). È stato dimostrato che NGAL aumenta anche in pazienti affetti da insufficienza cardiaca cronica, mostrando scarse correlazioni con la eGFR (Brisco e Testani, 2014); mentre in pazienti affetti da una condizione più grave di ADHF, l'incremento sierico di tale lipocalina (diversamente da quello urinario) è notevolmente correlato con l'aumento della sCr e della eGFR (Shrestha *et al.*, 2012). Si deduce, quindi, che l'aumento delle concentrazioni sieriche della lipocalina-2, è fortemente associato al peggioramento della funzionalità renale (WRF) e può essere usato come indicatore precoce di insufficienza renale in corso di ADHF (Ronco *et al.*, 2010).

4.4.3 *Cistatina C (Cys C)*

La cistatina C è una proteina (13 kDa) sintetizzata costantemente in tutte le cellule nucleate, liberamente filtrata a livello glomerulare e non secreta nei tubuli renali. Si è rivelata essere un buon biomarker di riduzione della GFR nei pazienti con CKD, dimostrando una migliore affidabilità della sCr, in quanto non influenzata dalla massa muscolare (Ronco *et al.*, 2010; Brisco e Testani, 2014). In corso di AKI, invece, l'escrezione urinaria di cistatina C è in grado di predire la necessità di una terapia sostitutiva della funzione renale (*Renal Replacement Therapy*) (Herget-Rosenthal *et al.*, 2004). Inoltre si è visto che, in pazienti affetti da insufficienza cardiaca, la stima della GFR basata sulla cistatina C è stata molto performante, perché dotata

di una minore *bias*, di una maggiore precisione ed accuratezza, rispetto ad altri metodi di stima della GFR; tuttavia tale proteina, non è in grado, ad oggi, di differenziare le diverse sindromi cardiorenali (Brisco e Testani, 2014).

4.4.4 Altri biomarker di SCR nell'uomo

Per fare diagnosi di SCR nell'uomo è possibile ricorrere anche ad altri biomarker, come la *Kidney Injury Molecule-1* (KIM-1), proteina che normalmente non è presente a livello renale (Brisco e Testani, 2014), ma che diventa rilevabile nelle urine dopo un insulto ischemico o nefrotossico alle cellule tubulari prossimali; è, quindi, un parametro di danno tubulare acuto fortemente specifico di AKI ischemica (Ronco *et al.*, 2010). Va tuttavia sottolineato che, nei pazienti affetti da insufficienza cardiaca, la KIM si correla debolmente con gli altri marker di danno tubulare, GFR e albuminuria (Brisco e Testani, 2014). Un comportamento analogo è stato studiato in un altro biomarker tubulare, la N-acetil-b-(D) glucosaminidasi (NAG), un enzima lisosomiale che riflette bene il grado di alterazione tubulare renale (Liangos *et al.*, 2007); infatti esso si riscontra nelle urine laddove è stata lesa l'integrità lisosomiale in corso di AKI. In numerosi studi sull'insufficienza cardiaca, la NAG è stata associata ad un aumento della mortalità, correlandosi con il grado di congestione venosa, mentre diminuisce con la somministrazione di diuretici (Brisco e Testani, 2014). Sfortunatamente, la NAG aumenta anche in corso di diabete ed ipertensione, limitando così la sua specificità nel differenziare una SCR da un danno tubulare di eziologia diversa; inoltre, è risultata elevata anche in pazienti affetti da insufficienza cardiaca, con funzionalità renale conservata (Damman *et al.*, 2011).

Infine è da rimarcare il ruolo dell'interleuchina 18 (IL-18), una citochina pro-infiammatoria riscontrabile, anch'essa, nelle urine dopo un danno ischemico acuto tubulare e che dimostra una buona sensibilità e specificità per la diagnosi di AKI ischemica. Essa aumenta nelle prime ore successive al danno renale, risultando nettamente più precoce della sCr (Ronco *et al.*, 2010); nei casi di ADHF è, tuttavia, scarsamente correlata con gli altri biomarker di insulto renale (Brisco e Testani, 2014).

- Amann K, Breitbach M, Ritz E *et al.* Myocyte/capillary mismatch in the heart of uremic patients. *Journal of the American Society of Nephrology*; JASN 1998; 9(6):1018-22.
- Austin WJ, Bhalla V, Hernandez-Arce I, Isakson SR, Beede J, Clopton P, Maisel AS, Fitzgerald RL. Correlation and prognostic utility of B-type natriuretic peptide and its amino-terminal fragment in patients with chronic kidney disease. *American Journal of Clinical Pathology* 2006; 126:506–512.
- Bagshaw SM, Cruz DN, Aspromonte N, Daliento L, Ronco F *et al.* Epidemiology of cardio-renal syndromes: workgroup statements from the 7th ADQI Consensus Conference. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2010; 25: 1406–1416.
- Bagshaw SM, Hoste EA, Braam B, *et al.* Cardiorenal syndrome type 3: pathophysiologic and epidemiologic considerations. *Contributions to Nephrology* 2013; 182:137-157.
- Bock JS e Gottlieb SS. Cardiorenal syndrome: new perspectives. *Circulation* 2010; 121:2592-2600.
- Bongartz LG, Cramer MJ, Doevendans PA *et al.* The severe cardiorenal syndrome: 'Guyton revisited'. *European Heart Journal* 2005; 26(1):11-7.
- Borgarelli M, Chiavegato D, Crosara S. Insufficienza cardiaca: fisiopatologia e principi di terapia. In: Santilli RA, Bussadori C, Borgarelli M. *Manuale di cardiologia del cane e del gatto*. 1th ed. Elsevier 2012 b; pag. 125-143
- Braam B, Cupples WA, Joles JA, Gaillard C. Systemic arterial and venous determinants of renal hemodynamics in congestive heart failure. *Heart Failure Reviews* 2012; 17:161–175.
- Brisco MA e Testani JM. Novel Renal Biomarkers to Assess Cardiorenal Syndrome. *Current Heart Failure Reports* 2014; 11(4): 485–499.
- Cruz DN, Schmidt-Ott KM, Vescovo G *et al.* Pathophysiology of cardiorenal syndrome type 2 in stable chronic heart failure: workgroup statements from the eleventh consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI). *Contributions to nephrology* 2013; 182:117-36.
- Damman K, Masson S, Hillege HL, Maggioni AP, Voors AA, Opasich C, *et al.* Clinical outcome of renal tubular damage in chronic heart failure. *European Heart Journal* 2011; 32:2705–12.
- Davis KL, Laine GA, Geissler HJ *et al.* Effects of myocardial edema on the development of myocardial interstitial fibrosis. *Microcirculation* 2000; 7(4):269-80.

- Di Lullo L, Floccari F, De Pascalis A, Marinelli A *et al.* Fisiopatologia e diagnosi della sindrome cardio-renale: stato dell'arte e prospettive future. *Giornale Italiano di Nefrologia* 2013; 30 (5):1-29.
- Erena Z, Ozverenb O, Buyukonerb E *et al.* A Single-Centre Study of Acute Cardiorenal Syndrome: Incidence, Risk Factors and Consequences. *Cardiorenal Medicine* 2012; 2:168–176.
- Grams ME e Rabb H. The distant organ effects of acute kidney injury. *Kidney international* 2012; 81(10):942-8.
- Hanada S, Takewa Y, Mizuno T *et al.* Effect of the technique for assisting renal blood circulation on ischemic kidney in acute cardiorenal syndrome. *Journal of artificial organs: the official journal of the Japanese Society for Artificial Organs* 2012; 15(2):140-5.
- Hatamizadeh P, Fonarow GC, Budoff MJ *et al.* Cardiorenal syndrome: pathophysiology and potential targets for clinical
- Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Husing J, Goring F, Pietruck F, Janssen O, Philipp T, Kribben A. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney International* 2004; 66:1115 – 1122.
- Jose P, Skali H, Anavekar N, Tomson C, Krumholz HM, Rouleau JL, Moya L, Pfeffer MA, Solomon SD. Increase in creatinine and cardiovascular risk in patients with systolic dysfunction after myocardial infarction. *Journal of the American Society of Nephrology* 2006; 17:2886 – 2891.
- Liangos O, Perianayagam MC, Vaidya VS, Han WK, Wald R, Tighiouart H, MacKinnon RW, Li L, Balakrishnan VS, Pereira BJ, Bonventre JV, Jaber BL. Urinary NAG activity and KIM-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology* 2007; 18:904 – 912.
- Maisel A, Hollander JE, Guss D *et al.* Primary Results of the Rapid Emergency Department Heart Failure Outpatient Trial (REDHOT) Multicenter Study of B-Type Natriuretic Peptide Levels, Emergency Department Decision Making, and Outcomes in Patients Presenting With Shortness of Breath. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 44 (6)
- management. *Nature Reviews Nephrology* 2013; 9(2):99-111
- McCullough PA, Agrawal V, Danielewicz E *et al.* Accelerated atherosclerotic calcification and Monckeberg's sclerosis: a continuum of advanced vascular pathology in chronic kidney diseases *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 2008; 3(6):1585-98.

- McCullough A. Cardiorenal Syndromes: Pathophysiology to Prevention. *International Journal of Nephrology* 2011; 2011:10.
- Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA *et al.* Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Critical Care* 2007; 11: R31.
- Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K *et al.* Identification of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Novel Early Urinary Biomarker for Ischemic Renal Injury. *Journal of American Society of Nephrology* 2003; 14: 2534–2543.
- Nimmo AJ, Than N, Orchard CH *et al.* The effect of acidosis on beta-adrenergic receptors in ferret cardiac muscle. *Experimental physiology* 1993; 78(1):95-103.
- Obi Y, Kim T, Saba P, Kovesdy CP, Amin AN e Kalantar-Zadeh K. Current and Potential Therapeutic Strategies for Hemodynamic Cardiorenal Syndrome. *Cardiorenal Medicine* 2016; 6: 83–98
- Prabhu SD. Cytokine-induced modulation of cardiac function. *Circulation Research* 2004; 95(12):1140-53.
- Quintavalla C. 2° Simposio di Cardiologia Umana e Veterinaria sull'Aldosterone. *Rivista di Zootecnia e Veterinaria* 2011; 45 (2): 15-20.
- Remuzzi G, Cattaneo D e Perico N. The aggravating mechanisms of aldosterone on kidney fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 2008; 19(8):1459-62.
- Ronco C, Haapio M, House AA, Anavekar N, Bellomo R. Cardiorenal syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* 2008; 52:1527–39.
- Ronco C, McCullough P, Anker SD, Anand I, Aspromonte A *et al.* Cardio-renal syndromes: report from the consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative. *European Heart Journal* 2010; 31: 703–711.
- Shrestha K, Shao Z, Singh D, Dupont M, Tang WHW. Relation of systemic and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels to different aspects of impaired renal function in patients with acute decompensated heart failure. *The American Journal of Cardiology* 2012; 110:1329–35.
- Trzeciak S, Dellinger RP, Parrillo JE *et al.* Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. *Annals of emergency medicine* 2007; 49(1):88-98.

Van Kimmenade RRJ, Januzzi JL *et al.* Renal Function, and Outcomes in Acute Heart Failure Redefining the Cardiorenal Interaction. Journal of the American College of Cardiology 2006; Vol. 48, No. 8.

Capitolo 5

Sindrome Cardio-Renale nei piccoli animali

5.1 Sindrome cardio-renale nei piccoli animali

Nonostante le patologie cardiache e renali siano ormai ben identificate nel cane e nel gatto, l'interazione tra i due sistemi (cardiovascolare e renale) è stata approfondita in tempi più recenti; solo nel 2015, infatti, è stato creato un *Cardio Renal Syndrome Consensus Group* al fine di sviluppare delle linee guida nella specie canina. Il gruppo è formato da 16 specialisti veterinari (9 cardiologi e 7 nefrologi) europei e del Nord America, che hanno collaborato per precisi obiettivi comuni: stabilire innanzitutto una definizione della SCR nel cane e nel gatto; indicare quali sono i possibili test diagnostici e trattamenti terapeutici; ed infine, rendere consapevoli i medici veterinari dell'importanza che riveste tale sindrome nei piccoli animali (Pouchelon *et al.*, 2015). E' stata scelta la definizione di "Disordini cardiovascolari-renali" (*Cardiovascular-renal disorders*, CvRD) che comprende tutto l'ampio spettro di possibili interconnessioni tra il sistema cardiovascolare e renale, che si possono verificare nei nostri pazienti (Pouchelon *et al.*, 2015). Tali interazioni originano da patologie molto diverse tra le due specie, ricordiamo infatti che: nell'ambito delle patologie cardiache, mentre nel cane prevalgono patologie valvolari primarie, cardiomiopatia dilatativa (CMD) e parassitosi, nel gatto riscontriamo maggiormente forme di cardiomiopatia ipertrofica. Riguardo il rene, invece, nel cane vi è un'alta prevalenza di patologie glomerulari, pielonefriti, necrosi acuta tubulare e patologie interstiziali (Macdougall *et al.*, 1986); nel gatto invece si assiste soprattutto a patologie renali croniche idiopatiche allo stato terminale (Chakrabarti *et al.*, 2013). Sebbene queste malattie non siano esattamente comparabili con quelle dell'uomo, esistono numerosi aspetti fisiopatologici in comune rappresentati da un complesso *interplay* tra cambiamenti emodinamici, attivazione neurormonale e stress ossidativo; questi aspetti similari, consentono di adottare le scoperte, fatte in medicina umana, in campo veterinario (**Fig. 5.1**).

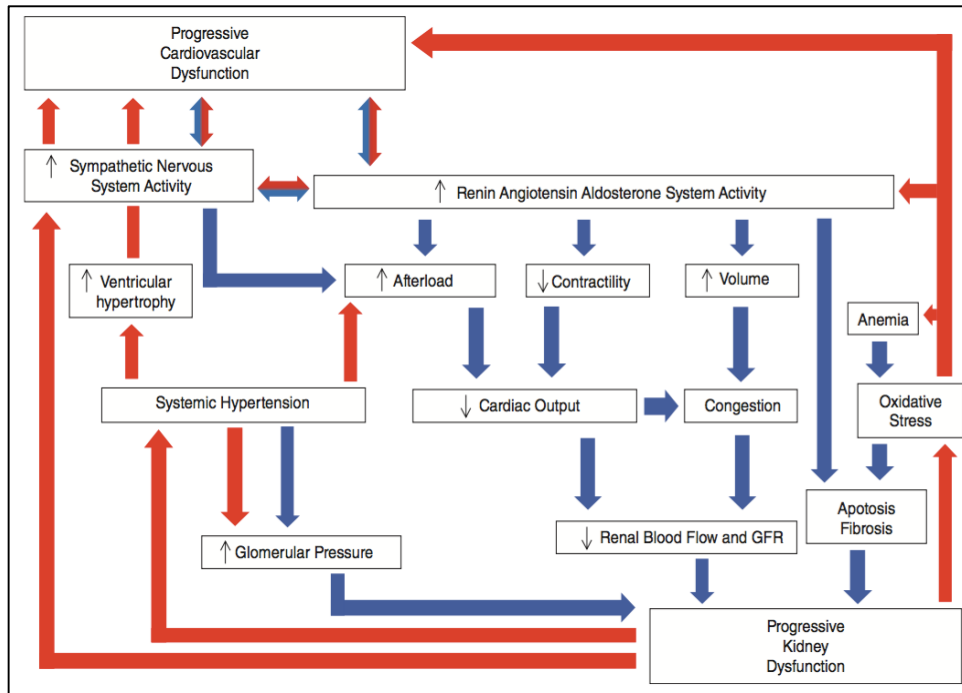


Fig. 5.1. Meccanismi (postulati) alla base dell'interazione tra l'insufficienza cardiaca e la disfunzione renale (modificato da Bock e Gottlieb., 2010).

I disordini cardiovascolari-renali nel cane e nel gatto, sono definiti come “la patologia e/o il danno strutturale/funzionale (indotto da tossine o farmaci) dell'apparato cardiovascolare o del rene, che altera le normali interazioni tra due sistemi e che porta al malfunzionamento di uno o entrambi”. Tale definizione, suscettibile di futuri cambiamenti in relazione alle continue ricerche, ha l'intento di fare da ‘ombrello’ a tutte quelle condizioni di possibile interdipendenza tra i due apparati, incoraggiando ad investigare la patologia cardiaca in caso di nefropatia e viceversa (Pouchelon *et al.*, 2015). Nel cane tali disordini sono stati suddivisi in 3 sottogruppi, al fine di tipizzare al meglio le loro caratteristiche: il primo sottogruppo CvRDh (*heart*) include tutte le patologie cardiovascolari, acute o croniche, da cui scaturiscono disfunzioni renali; il secondo CvRDk (*kidney*) comprende, al contrario, le disfunzioni renali provocate da problematiche cardiache (acute o croniche) ed, infine, i CvRDo (*other*), il terzo sottogruppo che rappresenta tutte le patologie renali e cardiache causate da altri processi patologici (farmaci, tossine, etc) (Fig. 5.2).

CvRD class	Aetiology
CvRD _H	Systemic hypertension leading to glomerular disease Cardiac shock, low cardiac output and systemic hypotension leading to decreased renal perfusion, azotaemia and acute kidney injury Systemic arterial thromboembolism leading to renal infarction Heartworm infection or caval syndrome leading to glomerulonephritis or AKI, respectively Passive congestion of the kidney during heart failure*
CvRD _K	Kidney-mediated systemic hypertension leading to increased afterload, left ventricular hypertrophy, worsening mitral or aortic insufficiency, arrhythmias, vasculopathy or retinopathy Volume overload leading to congestion or systemic hypertension Hypokalaemia or hyperkalaemia leading to cardiac arrhythmias Reduced renal clearance of drugs (e.g. digoxin) leading to toxicity Uraemic hypodipsia, anorexia or emesis leading to volume depletion and reduced cardiac output and perfusion Uraemic pericarditis Activation of the renin-angiotensin-aldosterone axis leading to sodium and water retention, cardiac and vascular remodelling or congestion Anaemia secondary to chronic kidney disease leading to volume overload and reduced cardiac tissue oxygenation*
CvRD _O	Septic or neoplastic emboli leading to renal and cardiac infarction Gastric dilation and volvulus leading to cardiac arrhythmias and azotaemia Infectious disease (e.g. <i>Trypanosoma cruzi</i>) Glycogen storage disease leading to glycogen deposition in the kidneys and heart Amyloidosis leading to amyloid deposition in the kidney and cardiac tissues*

Fig. 5.2. Eziologie proposte, possibili o sospette di CvRD (Pouchelon *et al.*, 2015).

5.2 Definizione e fisiopatologia dei Cardiovascular-Renal Disorders nel cane

5.2.1 Cardiovascular-Renal Disorders (*heart*)

Il primo sottogruppo dei CvRD_H, comprende tutte le condizioni in cui da una patologia cardiaca, cronica o acuta, scaturisce un danno/disfunzione renale. I meccanismi fisiopatologici responsabili sono, senza dubbio, analoghi a quelli citati nell'uomo, ovvero: la ridotta perfusione renale in risposta ad un *output* cardiaco insufficiente, l'attivazione del sistema neuro-endocrino (SNS e RAAS) e la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) come conseguenza dell'insulto endoteliale e della congestione venosa renale (Haase *et al.*, 2013). In caso di scompenso cardiaco acuto, si assiste ad un brusco calo della GFR, con incremento della creatinina, dell'azotemia ed un'evidente riduzione della produzione urinaria; è bene ribadire che un incremento della sCr di 0,3 mg/dl è sufficiente per parlare di AKI, sia nell'uomo che nei piccoli animali. Di seguito (**Fig. 5.3**) sono schematizzati i diversi gradi di AKI in relazione all'andamento della sCr e all'*output* urinario, secondo le linee guida IRIS (Harison *et al.*, 2012; <http://www.iris-kidney.com>).

AKI grades	Serum creatinine	Clinical description
I	<1.6 mg/dL (<140 µmol/l)	Non-azotaemic AKI: a. Documented AKI: (Historical, clinical, laboratory or imaging evidence of acute kidney injury, clinical oliguria/anuria, volume responsiveness)...and/or b. Progressive <i>non-azotaemic</i> increase in serum creatinine; ≥0.3 mg/dL (≥ 26.4 µmol/l) within 48 hours c. Measured oliguria (<1 ml/kg/hr) or anuria over 6 hours
II	1.7-2.5 mg/dL (141-220 µmol/L)	Mild AKI: a. Documented AKI and static or progressive azotaemia b. Progressive azotaemic increase in serum creatinine; ≥0.3 mg/dL (≥ 26.4 µmol/l) within 48 hours), or volume responsiveness? c. Measured oliguria (<1 ml/kg/h) or anuria over 6 hours
III	2.6-5.0 mg/dL (221-439 µmol/L)	Moderate to severe AKI: a. Documented AKI and increasing severities of azotaemia and functional renal failure
IV	5.1-10.0 mg/dL (440-880 µmol/L)	
V	>10.0 mg/dL (>880 µmol/L)	

Fig. 5.3. Stadiazione di AKI secondo le linee guida IRIS (Pouchelon *et al.*, 2015).

Le linee guida, sopra descritte, suggeriscono, in animali affetti da insufficienza cardiaca congestizia, l'utilizzo della dose minima efficace di diuretico ed un monitoraggio attento dei valori ematici renali, al fine di evitare l'insorgenza di AKI (Pouchelon *et al.*, 2015).

La prevalenza di CvRDh nel cane (e nel gatto) è ancora sconosciuta, tuttavia si suppone che sia maggiore nei soggetti geriatri in cui la possibilità di sviluppare malattie renali primarie (dovute all'invecchiamento stesso) è aggravata da una concomitante malattia cardiaca. Inoltre è fondamentale evidenziare che l'aumento dell'aspettativa di vita dei piccoli animali, dovuto ai progressi terapeutici, espone loro ad un effetto nefrotossico cumulativo dei diversi farmaci utilizzati per il cuore. Gli ACE-inibitori diventano nefrotossici se usati ad elevati dosaggi e quando somministrati in pazienti ipovolemici; la furosemide, analogamente, se utilizzata ai massimi dosaggi provoca sia un peggioramento della funzionalità renale (potenziando l'effetto degli ACE-inibitori) sia un'attivazione del RAAS che, come già discusso nel capitolo sulla CKD, induce significative alterazioni renali (es. proteinuria) (Pouchelon *et al.*, 2015). Inoltre, è stata dimostrata una diretta correlazione tra la somministrazione di furosemide e aumento specifico dell'urea; ciò è dovuto, probabilmente, al rallentamento del flusso renale (provocato dallo stato di insufficienza cardiaca) che fa persistere l'urea più a lungo nel lume tubulare, provocandone un maggiore riassorbimento (Martinelli *et al.*, 2016). L'osservazione che la disfunzione renale aumenti con l'aggravarsi della patologia cardiaca, è stata suffragata da due lavori rilevanti.

Il primo studio, di tipo retrospettivo, effettuato da Nicolle e collaboratori nel 2007, ha descritto come i cani con malattia mitralica cronica grave, a differenza dei cani in stadi meno avanzati, mostravano livelli di sCr e BUN più alti, con una GFR diminuita. Gli autori hanno precisato che resta da definire se questi valori rappresentano la diretta conseguenza dell'utilizzo dei farmaci nefrotossici o il risultato indiretto della patologia valvolare stessa (Nicolle *et al.*, 2007). Il secondo studio, sempre retrospettivo, condotto da Martinelli *et al* (2016) ha dimostrato, analogamente, che la prevalenza di CKD e anemia in cani affetti da CVD, era notevolmente più alta rispetto alla popolazione generale di cani esaminati nello studio; ciò suggerisce una reale influenza della patologia cardiaca sulla funzionalità renale. Gli autori hanno descritto come il management terapeutico, in corso di insufficienza cardiaca, influisca sulla prevalenza di CKD e come le classificazioni ACVIM e IRIS siano fortemente correlate tra di loro e con diversi parametri ecocardiografici. Ad esempio, gli stadi IRIS per l'insufficienza renale cronica, si correlano ai parametri di ingrandimento cardiaco (rapporto Atrio sinistro/ Aorta ed il diametro telediastolico del ventricolo sinistro), suggerendo una diretta connessione tra la disfunzione renale ed il rimodellamento cardiaco. Inoltre, il frequente rilevamento di cani affetti da un aumento della creatininemia in classe B1 ACVIM, fa supporre la possibile presenza di un danno renale primario in tali soggetti; questo può rendere difficile, così come nell'uomo, una diagnosi differenziale tra una SCR tipo 2 dalla SCR tipo 4 (Martinelli *et al.*, 2016). Nella definizione di CvRDh rientrano anche le patologie vascolari come l'ipertensione sistemica (*Systemic Hypertension*, SHT) che induce un significativo danno glomerulare, ben descritto in medicina veterinaria. La misurazione della pressione arteriosa si è rivelata un test diagnostico importante, laddove si sospetti una patologia glomerulare nel cane; si sottolinea inoltre che l'ipertensione, in assenza di ipoalbuminemia e disidratazione, raramente è responsabile di proteinuria (IRIS *Canine GN Study Group et al.*, 2013).

5.2.2 Cardiovascular-Renal Disorders (*kidney*)

Il secondo sottogruppo dei CvRDk comprende tutte le disfunzioni o danni cardiovascolari derivanti una patologia renale primaria, acuta o cronica; i meccanismi patogenetici alla base di tali interazioni sono ancora poco conosciuti nel cane e nel gatto, rispetto alle altre sindromi cardiorenali e la maggior parte delle ipotesi eziologiche sono assunte dalla medicina umana

(Pouchelon *et al.*, 2015). Alcune ipotesi di interazione tra i due sistemi si verificano in corso di patologie renali, laddove gli squilibri elettrolitici (es. iperkaliemia) possono peggiorare una condizione di AKI o CKD e, soprattutto, indurre aritmie (Bagshaw *et al.*, 2013); oppure in seguito all'utilizzo di farmaci usati per le cardiopatie (es. digossina, enalapril e atenololo), i quali possono indurre nefrotossicità. Tali sostanze, escrete a livello renale, inducono una riduzione della clearance glomerulare e si accumulano a livello sistemico, generando aritmie, ipotensione e peggioramento della funzione miocardica (Pouchelon *et al.*, 2015).

Altri fenomeni di interdipendenza tra i due sistemi sono rappresentati da una condizione di ipovolemia, potenzialmente presente nei pazienti uremici, a causa del vomito e della poliuria; tale condizione, a sua volta, induce una riduzione dell'output cardiaco.

Tuttavia è possibile riscontrare anche una condizione inversa di ipervolemia, causata dal danno renale responsabile del sovraccarico volumetrico; tale condizione contribuisce ad una congestione sistemica, specialmente negli animali aventi già patologie cardiache ed anemie severe (Pouchelon *et al.*, 2015). Infine, si può assistere ad un'anemia di origine renale, tipicamente di basso grado e ad uno stato di ipertensione, conseguente alla CKD, che può indurre ipertrofia cardiaca sia nei cani (Misbach *et al.*, 2011) che nei gatti (Chetboul *et al.*, 2003; Sampedrano *et al.*, 2006).

5.2.3 Cardiovascular-Renal Disorders_(other)

Quest'ultimo sottogruppo comprende tutte le condizioni in cui un terzo processo patologico primario (es. sepsi o malattie infettive) scatena un danno renale e cardiovascolare, nonché tutti i casi in cui le patologie cardiache (es. CVD) e renali (es. patologia glomerulare primaria) coesistono in partenza. Tuttavia, allo stato attuale, tali sindromi cardio-renali sono poco definite e conosciute nei piccoli animali (Pouchelon *et al.*, 2015).

5.3 Diagnosi e Stadiazione clinica dei CvRD

5.3.1 Classificazione dei pazienti nefropatici e cardiopatici

Attualmente, la classificazione più idonea, sia per l'*Acute Kidney Injury* (AKI) che per la *Chronic Kidney Disease* (CKD), è stata definita dall'IRIS che, come già discusso, ha delineato degli algoritmi diagnostici specifici, per entrambe le condizioni patologiche.

Lo schema per la definizione dell'AKI (**Fig. 36**), comprende elementi significativi della fisiopatologia della SCR, quali: l'aumento della sCr, la produzione urinaria, la microalbuminuria e l'aumento del rapporto PU/CU; mentre in quello della CKD, com'è noto, la stadiazione viene basata anche sulla pressione arteriosa che rappresenta un elemento fondamentale nell'interazione cuore-rene (Pouchelon *et al.*, 2015).

Per quanto concerne l'inquadramento delle patologie cardiache nell'ambito delle sindromi cardiorenali, i membri del CRS *Consensus Group* hanno riscontrato un'effettiva difficoltà nell'individuare una classificazione adeguata per i pazienti cardiopatici.

Il sistema dell'*International Small Animal Cardiac Health Council* (ISACHC), infatti, classifica gli animali solo in base ai segni clinici di insufficienza cardiaca e la presenza o meno di ipertrofia cardiaca; non considera gli aspetti anatomici né diagnostici, non raggiungendo quindi il consenso dei membri (Pouchelon *et al.*, 2015). L'alternativa, ovvero la classificazione ACVIM (Atkins *et al.*, 2009) non include fattori come l'ipertensione sistemica, disfunzioni diastolica e sistolica, aritmie e alterazioni dei biomarker cardiaci. Sono state, quindi, approfondite altre vie diagnostiche, ovvero la valutazione dei biomarker, l'*imaging* e la misurazione della pressione arteriosa.

5.3.2 Biomarker di CvRD: i test tradizionali e le nuove scoperte

Nell'ambito dei CvRDh, non esistono, fino ad oggi, biomarker specifici, per cui si ricorre all'utilizzo sia dei parametri standard di funzionalità renale, che quelli nuovi, tutti differenziati in base alla sede anatomica colpita, come riportato in **Tab. 5.1**.

Tab. 5.1. Parametri tradizionali e nuovi per definire il danno renale (Pouchelon et al., 2015).

Classificazione del danno renale sulla base di test tradizionali e nuovi biomarker		
Sede del danno		Test / biomarker
GFR	tradizionali	Creatinina Tecniche di clearance plasmatica
	nuovi potenziali biomarker	Dimetilarginina Simmetrica (SDMA)
Permeabilità/selettività glomerulare	tradizionali	albumina sierica PU/CU Microalbuminuria
	nuovo potenziale biomarker	immunoglobulina G urinaria
Disfunzione o danno tubulare	tradizionali	creatinina, elettroliti e bicarbonato (sierici) glucosio, amminoacidi (urinari), PU/CU, USG
	nuovi potenziali biomarker	<i>Urine N-acetyl B-D-glucosaminidase (NAG)</i> <i>Urine retinol-binding protein (RBP)</i> <i>Urine gamma-glutamyl transpeptidase (GGT)</i> <i>Urine cystatin-C</i> <i>Urine kidney injury molecule-1 (KIM-1)</i> <i>Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)</i> <i>Urinary clusterin</i>

La validità di tali parametri è stata ormai ben chiarita sia nella patogenesi dell'AKI che della CKD e, sebbene non siano in grado di discernere tra un danno renale primario ed uno secondario in corso di CvRDh, conservano comunque un'elevata sensibilità diagnostica (Pouchelon *et al.*, 2015). Analogamente, per il sottogruppo dei CvRDk, non esistono biomarker esclusivi, ma vanno considerati i test standard di funzionalità cardiaca ovvero i peptidi natriuretici (NT-pro BNP, BNP ed il NT-proANP) e la troponina I cardiaca (cTnI). Tali marker, pur essendo stati ampiamente studiati, non hanno ancora la stessa validità di quelli renali e non consentono una stratificazione dei pazienti. Ad esempio, i peptidi natriuretici costituiscono un complesso sistema di ormoni che, come già descritto, ha lo scopo di regolare il volume plasmatico, l'escrezione di sodio ed il tono vasomotore (Potter *et al.*, 2009). Le loro concentrazioni sieriche sono molto variabili, dipendono infatti dalla gravità della patologia cardiaca, da variazioni individuali e dalla razza (soprattutto l'NT-pro BNP) (Sjostrand *et al.*, 2014). E' stato dimostrato che in animali con funzionalità cardiaca apparentemente normale, ma con una concomitante disfunzione renale (acuta o cronica), le concentrazioni di NT-proBNP, BNP e cTnI aumentano; considerando che tali sostanze sono influenzate anche dall'escrezione renale, risulta difficile capire se l'origine del loro aumento è dovuta alla maggiore produzione cardiaca o alla diminuita escrezione renale (Pouchelon *et al.*, 2015).

La troponina cardiaca, componente del complesso actina-miosina, è risultata elevata in cani e gatti con patologie cardiache primarie e secondarie, permettendo di stabilire l'*outcome* dei pazienti (Hezzell *et al.*, 2012); questo significa che la cTnI potrebbe essere in grado di svelare anche una patologia cardiaca subclinica in soggetti affetti da CvRDk. Tuttavia, mancano dati sull'andamento e la quantità di cTnI prodotta in corso di altre patologie (Pouchelon *et al.*, 2015).

5.3.3 Imaging nei CvRD

Il CvRD *Consensus Group* raccomanda, fortemente, di eseguire sia radiografie toraciche, al fine di escludere segni di insufficienza cardiaca congestizia, ovvero alterazioni della silhouette cardiaca, delle strutture vascolari e del pattern polmonare; sia ecocardiografie, per stabilire la morfologia, le lesioni e l'emodinamica del cuore.

Le informazioni ricavate con tali tecniche, definite le due “pietre angolari” dell'iter diagnostico dell'apparato cardiovascolare, unite all'anamnesi,

all'esame clinico, all'elettrocardiografia e alle analisi di laboratorio, consentono di individuare la presenza, l'eziologia, la gravità e le conseguenze della patologia cardiaca (Pouchelon *et al.*, 2015).

La medesima raccomandazione è stata suggerita per la valutazione renale: l'esame radiografico, in particolare nella proiezione ventro-dorsale, consente di stabilire la grandezza ed il numero dei reni, nonché di confrontare i due organi e rilevare uroliti radiopachi. L'ecografia, invece, fornisce moltissime informazioni sulle anomalie parenchimali, dilatazioni pelviche ed ureterali (a differenza di alterazioni minori, poco rilevabili), anomalie del flusso renale, presenza di cisti, infarti, mineralizzazioni e molto altro ancora (Debruyn *et al.*, 2012). Infine è possibile avvalersi di tecniche di diagnostica avanzate, quali contrastografie, tomografia computerizzata e risonanza magnetica con contrasto, per studi morfofunzionali più dettagliati (Pouchelon *et al.*, 2015).

5.3.4 Misurazione della pressione arteriosa

L'ipertensione arteriosa sistemica (SHT) è il migliore esempio di interazione tra il rene e l'apparato cardiovascolare, in grado di spiegare l'insorgenza dei tre sottogruppi delle CvRD. Sia il rene che il cuore, infatti, sono organi suscettibili di un danno da ipertensione e, pertanto, le linee guida nella gestione delle Sindromi Cardio-Renali consigliano, fortemente, di misurare la pressione arteriosa in modo sistematico.

Nel cane, la SHT induce un aumento del danno renale, della proteinuria e dell'incidenza di crisi uremiche, mentre riduce la GFR; nel gatto, invece, la relazione causale tra ipertensione e patologia renale è meno chiara (Pouchelon *et al.*, 2015). In uno studio eseguito su gatti affetti da CKD, la persistenza di valori pressori elevati è stata associata a glomerulosclerosi e arteriosclerosi iperplastica (Chakrabarti *et al.*, 2013). Altri studi osservazionali eseguiti nel cane e nel gatto affetti da SHT hanno riportato la presenza di *pattern* ipertrofici del ventricolo sinistro (Sampedrano *et al.*, 2006), di un'inversione dell'ipertrofia ventricolare a seguito di una gestione terapeutica della pressione arteriosa (Snyder *et al.*, 2001) e di una vasculopatia retinica (Pouchelon *et al.*, 2015). Inoltre, studi eseguiti con Doppler tissutale bidimensionale hanno dimostrato che la SHT, sia nel cane che nel gatto, si associa ad una disfunzione diastolica ed, in minor misura, sistolica, a prescindere dalla presenza di ipertrofia miocardica (Sampedrano *et al.*, 2006). La SHT ha una prevalenza del 60-90% nei cani e del 20-65% nei gatti affetti da patologie renali (Stepien, 2014); Martinelli

e collaboratori hanno rilevato, in cani affetti da CVD, una correlazione diretta tra i valori di urea, sCr e pressione arteriosa, asserendo che la causa risiede nell'attivazione del sistema RAAS in corso di malattia renale cronica (Martinelli *et al.*, 2016). Una precisa relazione, invece, tra SHT e malattia valvolare non è ancora completamente chiarita nel cane, così è stato osservato come la pressione arteriosa varia molto a seconda dello stadio della malattia (Petit *et al.*, 2013). Infine, la SHT è comunemente associata anche ad alcune endocrinopatie (iperadrenocorticismo, feocromocitoma ed ipertiroidismo) e all'utilizzo di determinati farmaci, come glucocorticoidi, mineralcorticoidi ed eritropoietina (Brown *et al.*, 2007). E' bene evidenziare che anche uno stato di ipotensione (definita come pressione sistolica inferiore a 90 mmHg) può causare danni renali e cardiovascolari; un stato severo di ipovolemia, e quindi di ipotensione, può determinare un ridotto output cardiaco o collasso delle resistenze, con conseguente riduzione della perfusione renale ed attivazione dei sistemi adattativi neuromonali (Pouchelon *et al.*, 2015). L'ipotensione è riscontrabile in corso di insufficienza cardiaca acuta, nel 16% dei cani e gatti ospedalizzati (Goutal *et al.*, 2010); così come è stato visto che, in un gruppo di cani affetti da CVD, la pressione sistolica è inversamente proporzionale alla gravità della patologia e che, laddove lo stato ipotensivo è significativo, si può instaurare un danno renale da ipoperfusione (Petit *et al.*, 2013).

5.4 Management dei CvRD

Il *Cardio Renal Syndrome Consensus Group* ha delineato, infine, il management corretto per le diverse Sindromi Cardio-Renali nel cane e nel gatto (Pouchelon *et al.*, 2015).

5.4.1 CvRDh

In caso di uno scompenso cardiaco acuto, il paziente va ospedalizzato per ripristinare la funzionalità cardiaca, alleviare la congestione e, al tempo stesso, monitorare i rischi di una disfunzione renale. La terapia standard per una CHF acuta include tipicamente la somministrazione di: diuretici, ACE-inibitori, vasodilatatori e inotropi positivi; i relativi dosaggi di tali farmaci vanno modificati in relazione al peso corporeo, allo stato di idratazione, ai parametri renali, alla pressione arteriosa e all'*output* urinario.

Questa dichiarazione, approvata con una forte approvazione dai membri del consenso, ha un duplice scopo: quello di aumentare la consapevolezza sugli effetti nocivi che la terapia cardiologica può avere sul rene e sullo stato di idratazione e quello di indicare le possibili strategie per ridurre al minimo tali effetti. Ad esempio, per evitare l'aumento di sCr nei pazienti trattati per CHF acuta, si può ridurre, da un lato, il dosaggio giornaliero totale dei diuretici endovenosi (agendo sia sulle dosi che sulla frequenza di somministrazione); dall'altro si possono utilizzare vasodilatatori arteriosi (pimobendan, dobutamina), per ridurre il precarico e il postcarico, e inotropi positivi per migliorare la gittata cardiaca e la perfusione renale.

Gli ACE-I non vengono comunemente utilizzati in pazienti ospedalizzati con CHF, a causa della scarsa evidenza di una loro reale efficacia in associazione con furosemide e pimobendan; ma, se il paziente viene dimesso, gli ACE-I vengono solitamente reintrodotti, come *home based therapy* (Atkins *et al.*, 2009). Una possibile strategia da adottare con tali farmaci è la scelta del dosaggio minimo, riportato nei range raccomandati, seguita da un'attenta valutazione dello stato di idratazione del paziente e della funzionalità renale.

I pazienti cardiopatici devono avere sempre libero accesso a fonti di acqua, a meno che non presentino vomito; così come devono ricevere una scrupolosa fluidoterapia, se gravemente disidratati o con valori di azotemia elevati e, ancora, un'alimentazione con sondino se anoressici (Pouchelon *et al.*, 2015). In caso di insufficienza cardiaca cronica, si può aggiungere alla terapia lo spironolattone (Bernay *et al.*, 2010) di cui devono essere ancora approfonditi i potenziali effetti anti-rimodellamento cardiaco, renale e vascolare, in pazienti con CvRD_h (Ovaert *et al.*, 2010).

5.4.2 CvRD_k

In corso di AKI, è necessaria l'ospedalizzazione al fine di riattivare la circolazione renale e ristabilire l'equilibrio idro-elettrolitico, tenendo sempre in considerazione i possibili effetti collaterali sul cuore. Si raccomanda di utilizzare fluidi appropriati (poveri di sodio), con l'aggiunta di diuretici ed antipertensivi; se occorre, vanno rivalutati i dosaggi di un'eventuale terapia cardiaca concomitante.

I membri del *Consensus Group*, sulla base della loro esperienza clinica, hanno definito i diuretici come una "spada a doppio taglio" perché se da un lato riducono la congestione sistemica di origine cardiaca, dall'altro aumentano il rischio di insorgenza di AKI, specialmente nei soggetti in cui

tali farmaci sono abusati (es. cani con tosse e gatti dispnoici, senza una reale insufficienza cardiaca congestizia). Inoltre, gli autori hanno anche evidenziato che i diuretici (in particolare la furosemide) vengono utilizzati per periodi troppo lunghi e ad alti dosaggi, con il rischio di indurre una secchezza delle secrezioni respiratorie ed un innalzamento della creatininemia (Pouchelon *et al.*, 2015).

La fluidoterapia, in pazienti disidratati affetti da CvRDk, deve essere continuamente monitorata ed associata al monitoraggio pressorio, per scongiurare uno stato di congestione caratterizzato semiologicamente da tachipnea, distensione delle vene giugulare, aumento del peso corporeo; in tal caso la somministrazione di fluidi va interrotta. Infine, è consigliato di utilizzare la dopamina solo in caso di ipotensione sistemica e non come terapia dell'AKI, perché non esiste una comprovata efficacia di tale farmaco, mentre sono molto più probabili gli effetti collaterali (peggioramento della funzionalità renale e aritmie) (Pouchelon *et al.*, 2015). Per quanto riguarda la pressione arteriosa sistemica, il *Consensus Group* ha stabilito che l'obiettivo principale è non far superare i valori di 160 mmHg, per impedire un danno d'organo target. La strategia terapeutica prevede una dieta con restrizione di sodio, l'utilizzo di ACE-I nel cane e di amlodipidina nel gatto; in caso di SHT refrattaria, la combinazione dei due principi attivi è raccomandata in entrambe le specie (Pouchelon *et al.*, 2015).

Un ultimo concetto importante da considerare, in tutti i sottogruppi di CvRD, è la possibile alterazione della farmacocinetica e farmacodinamica dei farmaci utilizzati, a causa delle disfunzioni renale e cardiaca. Per esempio, la furosemide avrà una scarsa risposta nei soggetti in cui è presente una ridotta perfusione renale o un danno tubulare, perché è proprio a tale livello che il diuretico viene secreto ed esplica il suo effetto. La digossina, l'enalapril e l'atenololo hanno un'escrezione principalmente renale, per cui vanno modificate le relative dosi in caso di pazienti affetti da AKI o CKD (Pouchelon *et al.*, 2015). Inoltre, laddove vi è una condizione di acidosi metabolica o ipoprotidemia (es. cachessia), il dosaggio di quei farmaci che si legano fortemente alle proteine, come il pimobendan o la digossina, deve essere modificato (Freeman, 2012).

Infine, gli autori hanno sottolineato l'importanza di una corretta nutrizione, specialmente nei pazienti cardiopatici affetti da cachessia, che garantisca un giusto apporto di proteine e calorie, fondamentali per consentire l'assorbimento e l'efficacia dei farmaci; è previsto anche l'uso di acidi grassi omega 3, per le loro proprietà antiossidanti e oressizzanti,

nonostante la loro sicurezza ed efficacia non siano state ancora rigorosamente provate (Lenox e Bauer, 2013).

- Atkins C, Bonagura J, Ettinger S, Fox P, Gordon S, Haggstrom J, Hamlin R, Keene (Chair), Luis-Fuentes V, Stepien R. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2009; 6: 1142-50.
- Bagshaw SM, Hoste EA, Braam B, *et al.* Cardiorenal syndrome type 3: pathophysiologic and epidemiologic considerations. *Contributions to Nephrology* 2013; 182:137-157.
- Bernay F, Bland JM, Haggstrom J, *et al.* Efficacy of spironolactone on survival in dogs with naturally occurring mitral regurgitation caused by myxomatous mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2010; 24:331-341.
- Bock JS e Gottlieb SS. Cardiorenal syndrome: new perspectives. *Circulation* 2010; 121:2592-2600.
- Brown S, Atkins C, Bagley R, Carr A, Cowgill L, Davidson M, Egner B *et al.* Guidelines for the Identification, Evaluation, and Management of Systemic Hypertension in Dogs and Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2007; 21:542–558.
- Chakrabarti S, Syme HM, Brown CA, *et al.* Histomorphometry of feline chronic kidney disease and correlation with markers of renal dysfunction. *Veterinary Pathology* 2013; 50:147-155.
- Chetboul V, Lefebvre HP, Pinhas C, *et al.* Spontaneous feline hypertension: clinical and echocardiographic abnormalities, and survival rate. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2003; 17:89-95.
- Debruyne K, Haers H, Combes A, *et al.* Ultrasonography of the feline kidney: technique, anatomy and changes associated with disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2012; 14:794-803.
- Freeman LM. Cachexia and sarcopenia: emerging syndromes of importance in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2012; 26, 3-17.
- Goutal CM, Keir I, Kenney S, *et al.* Evaluation of acute congestive heart failure in dogs and cats: 145 cases (2007-2008). *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2010; 20:330-337.
- Haase M, Muller C, Damman K *et al.* Pathogenesis of cardiorenal syndrome type 1 in acute decompensated heart failure: workgroup statements from the eleventh consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI). *Contributions to Nephrology* 2013; 182, 99-116.

- Hansson K, Häggström J, Kvarfvenberg C, Lord P. Left atrial to aortic root indices using two-dimensional and M-mode echocardiography in Cavalier King Charles spaniels with and without left atrial enlargement. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 2002; 43:568–575.
- Hezzell MJ, Boswood A, Chang YM, *et al.* The combined prognostic potential of serum high-sensitivity cardiac troponin I and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide concentrations in dogs with degenerative mitral valve disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2012; 26:302-311.
- International Renal Interest Society guidelines (IRIS) 2015. www.iris-kidney.com.
- IRIS Canine GN Study Group Diagnosis Subgroup, Littman MP, Damminet S, *et al.* Consensus recommendations for the diagnostic investigation of dogs with suspected glomerular disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2013; 27: S19-26.
- Lennox CE e Bauer JE. Potential adverse effects of omega-3 Fatty acids in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2013; 27:217-226.
- MacDougall DF, Cook T, Steward AP *et al.* Canine chronic renal disease: prevalence and types of glomerulonephritis in the dog. *Kidney International* 1986; 29: 1144-1151.
- Martinelli E, Locatelli C *et al.* Preliminary Investigation of Cardiovascular–Renal Disorders in Dogs with Chronic Mitral Valve Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2016; 30:1612–1618.
- Nicoll AP, Chetboul V, Allerheiligen T, *et al.* Azotemia and glomerular filtration rate in dogs with chronic valvular disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2007; 21:943-949.
- Ovaert P, Elliott J, Bernay F, *et al.* Aldosterone receptor antagonists– how cardiovascular actions may explain their beneficial effects in heart failure. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2010; 33:109-117.
- Petit AM, Gouni V, Tissier R, *et al.* Systolic arterial blood pressure in small-breed dogs with degenerative mitral valve disease: a prospective study of 103 cases (2007-2012). *Veterinary Journal* 2013; 197:830-835.
- Potter LR, Yoder AR, Flora DR, *et al.* Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2009; 191:341-366.

- Pouchelon JL, Atkins CE, Bussadori C, Oyama MA *et al.* Cardiovascular–renal axis disorders in the domestic dog and cat: a veterinary consensus statement. *Journal of Small Animal Practice* 2015; 56, 537–552.
- Sampedrano C, Chetboul V, Gouni V *et al.* Systolic and diastolic Myocardial dysfunction in cats with hypertrophic cardiomyopathy or systemic hypertension. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2006; 20:1106-1115.
- Sjostrand K, Wess G, Ljungvall I, *et al.* Breed differences in natriuretic peptides in healthy dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2014; 28:451-457.
- Snyder PS, Sadek D, Galin L *et al.* Effect of amlodipine on echocardiographic variables in cats with systemic hypertension. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2001; 15:52-56.
- Stepien RL. Systemic Hypertension. In: Bonagura JD and Twedt DC. *Kirk's Current Veterinary Therapy*. XV ed. St. Louis: Elsevier Saunders 2014; pag. 726-73.

Capitolo 6

Materiali e metodi

6.1 Animali arruolati e disegno sperimentale

Per la realizzazione del nostro studio sono stati valutati 50 cani affetti da malattia mitralica cronica (CVD), condotti a visita presso il Servizio di Cardiologia dell'Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD) del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali.

La diagnosi di malattia mitralica cronica è stata fatta attraverso i rilievi clinici ottenuti dall'esame fisico diretto e i rilievi strumentali, principalmente radiologici ed ecocardiografici. Sono stati quindi selezionati 12 animali (Gruppo Patologici GP), tutti esenti da terapia cardiovascolare e che non presentavano alcun segno di insufficienza renale sulla base dei rilievi clinici, dell'esame ecografico, dei parametri ematobiochimici e dell'esame chimico-fisico delle urine. In particolare i valori di azotemia, creatininemia e di PU/CU, al momento dell'inclusione, dovevano essere compresi nei range stabiliti per la specie canina (**Tab. 6.1**) (Kaneko *et al.*, 2008; <http://www.iris-kidney.com>).

Tab. 7. Range di normalità dei parametri renali Crea, BUN e PU/CU (Kaneko *et al.*, 2008; <http://www.iris-kidney.com>)

Parametro renale	Range
Creatinina	< 1,4 mg/dl
BUN	10-28 mg/dl
PU/CU	< 0,2 (non proteinurico)
	0,2 - 0,5 (borderline)
	> 0,5 (proteinurico)

Ciascun animale appartenente al gruppo GP è stato valutato per sei mesi, ovvero al momento dell'inclusione (T_0), a 3 mesi (T_1) e a 6 mesi (T_2); in aggiunta, tutti i soggetti sono stati classificati, nel tempo, secondo i criteri ACVIM e IRIS. Contestualmente, nell'ambito della popolazione generale canina condotta a visita presso lo stesso ospedale, sono stati selezionati 10 cani sani, come gruppo di controllo (GC).

Per entrambi i gruppi, sono stati inclusi cani di ambo i sessi e di ogni razza, con peso non superiore ai 25 kg ed età non superiore ai 12 anni, per ridurre la probabilità di riscontrare alterazioni della funzionalità renale legate all'età; nessuno dei cani di sesso femminile era in gravidanza o in

lattazione. Ulteriori criteri di esclusione adottati nell'arruolamento dei soggetti erano rappresentati da: 1) ipertensione arteriosa sistemica; 2) malattie broncopolmonari croniche; 3) patologie endocrine (diabete mellito, ipotiroidismo, sindrome di Cushing, etc.); 4) malattie sistemiche di natura infiammatoria o infettiva (es. leishmaniosi, ehrlichiosi, etc.); 5) malattie neoplastiche. Il protocollo del suddetto studio è stato approvato dall' *Ethical Animal Care and Use Committee* dell'Università degli Studi di Napoli Federico II e i proprietari, correttamente informati, hanno firmato un modulo di consenso informato.

6.2 Esame clinico

Tutti i cani selezionati sono stati sottoposti ad un'attenta valutazione clinica comprendente l'esame obiettivo generale e l'esame obiettivo particolare degli apparati cardio-circolatorio e renale. Tutte le procedure diagnostiche di tipo strumentale sono state effettuate in un ambiente tranquillo, in modo da evitare la variabilità nei rilievi dovuta a condizioni di eccitazione. Infine, è stato sottoposto ad ogni proprietario un questionario riguardante le informazioni nutrizionali.

6.3 Indagini strumentali

6.3.1 Misurazione della pressione arteriosa

La pressione arteriosa sistemica (diastolica-PAD, sistolica-PAS e media-PAM) è stata misurata attraverso un metodo non invasivo oscillometrico (Brown *et al.*, 2007; Piantedosi *et al.*, 2016), utilizzando un apparecchio automatico (VETHDO, S+B Medie Systeme) e adeguando la misura dei bracciali a seconda del soggetto. La misurazione veniva ottenuta attraverso il posizionamento del manicotto a livello dell'arteria radiale, si registravano 5 misurazioni pressorie consecutive e, scartati il valore più alto e quello più basso, si calcolava la media sulle tre misure rimanenti.

6.3.2 Esame elettrocardiografico

Su ogni soggetto è stato eseguito un ECG standard a 6 derivazioni (I-II-III, aVR, aVL, aVF), utilizzando un elettrocardiografo portatile (08 SD, BTL ITALIA); laddove ritenuto necessario, sono state effettuate anche le

derivazioni precordiali in numero di 4 o 6 (Tilley, 1985; Porciello e Ciaramella, 2014).

6.3.3 Esame ecocardiografico

È stato altresì condotto, da un unico operatore, un esame ecocardiografico completo con l'animale posto in decubito laterale, utilizzando un apposito tavolo da ecocardiografia provvisto di incavo laterale. A seconda della taglia del soggetto, veniva utilizzata una sonda *phased-array* per adulti con frequenza di 7.5-10 MHz ed una sonda *phased-array* pediatrica con frequenza di 2.5-5 Mhz (MyLab 30, Esaote). Le misurazioni in formato M-mode, B-mode ed eco Doppler venivano ottenute secondo le comuni metodiche descritte in letteratura (Sahn *et al.*, 1978; Bonagura, 1983; Thomas, 1984; Shoher e Fuentes, 2001; Hansson *et al.*, 2002). Tutti i parametri ecocardiografici erano espressi come media di tre valori ottenuti su cicli cardiaci differenti.

Misurazioni in M-mode

- Diametro interno del ventricolo sinistro in diastole (DdVS) (mm)
- Diametro interno del ventricolo sinistro in sistole (DsVS) (mm)
- Spessore del setto interventricolare in diastole (SIVd) (mm)
- Spessore del setto interventricolare in sistole (SIVs) (mm)
- Spessore della parete libera posteriore in diastole (PPd) (mm)
- Spessore della parete libera posteriore in sistole (PPs) (mm)
- Frazione d'ispessimento del setto interventricolare (FI-SIV) (%)
- Frazione d'ispessimento della parete libera posteriore (FI-PP) (%)

Parametri di funzionalità sistolica e di sovraccarico del ventricolo sinistro.

- Frazione di accorciamento (FA) (%)
- Frazione di eiezione (FE) (%)

Sono stati calcolati inoltre il volume telediastolico (EDV) ed il volume telesistolico del ventricolo sinistro (ESV) utilizzando la seguente formula di Teicholz: $EDV = (DdVS^3 \times 7) / (DdVS + 2.4)$ e $ESV = (DsVS^3 \times 7) / (DsVS + 2.4)$ (Kienle e Thomas, 1995). I valori ottenuti sono stati, successivamente, indicizzati per l'area di superficie corporea, ottenendo,

rispettivamente l'indice di volume telesistolico (ESV-I) (ml/m^2) e l'indice di volume telediastolico (EDV-I) (ml/m^2).

Misurazioni in B-mode

In formato B-mode veniva calcolato il rapporto tra le misurazioni lineari dell'atrio sinistro e dell'aorta (As/Ao), misurati dalla scansione parasternale dx in asse corto alla base cardiaca.

Misurazioni eco-Doppler

Attraverso la metodica eco-Doppler (PW e CW) venivano misurati i seguenti parametri:

- Velocità di picco della polmonare con relativo gradiente pressorio (AO Vmax) (m/sec)
- Velocità di picco dell'aorta con relativo gradiente pressorio (PA Vmax) (m/sec)
- Velocità dell'onda A del flusso transmitralico (A) (cm/sec)
- Velocità dell'onda E del flusso transmitralico (E) (cm/sec)
- Tempo di decelerazione dell'onda E (TDE) (m/sec)

Infine, veniva valutato il pattern di flusso transmitralico attraverso il rapporto tra la velocità dell'onda E e dell'onda A (E/A).

6.3.4 Esame ecografico dell'apparato urinario

In tutti i soggetti è stato eseguito, da un unico operatore, un esame ecografico dell'apparato urinario in decubito dorsale, utilizzando, a seconda della taglia una sonda microconvex con frequenza di 6,6 MHz e una sonda lineare con frequenza di 7,5-12 MHz (MyLab 30, Esaote). Sono state escluse patologie renali sulla base della valutazione delle dimensioni, margini, ecostruttura e vascolarizzazione di ambo gli organi. A carico della vescica è stata verificata l'assenza di lesioni neoplastiche/flogistiche della parete vescicale e di formazioni calcolotiche all'interno del lume.

6.4 Indagini di laboratorio

6.4.1 Analisi ematobiochimiche

In tutti i cani, previo digiuno di 12 ore, sono stati prelevati 10 ml di sangue venoso, di cui 1 ml è stato raccolto in una provetta con K3-EDTA per l'esecuzione di un esame emocromocitometrico completo; i restanti 9 ml, sono stati invece suddivisi in parti uguali e raccolti in due distinte provette senza anticoagulante, in modo da ottenere, dopo centrifugazione a 2500 rpm per 15 minuti, due aliquote di siero da 2 ml ciascuna. Le suddette aliquote sono state conservate a 20°C e scongelate subito prima di essere analizzate. Il siero ottenuto è stato usato per effettuare un pannello ematobiochimico completo (azotemia, creatininemia, BUN, GPT, ALP, γ -GT, glicemia, trigliceridi, colesterolo, sodio, potassio, calcio, fosforo ed il quadro proteico elettroforetico). Tutte le determinazioni ematobiochimiche sono state condotte presso i Laboratori di Chimica Clinica dell'OVUD, mediante metodica spettrofotometrica (Multianalyzer SABA 18, AMS); gli elettroliti sono stati determinati con spettrofotometria a fiamma (I.L. Instrument 943; Fotometro Hydra 09, Seleco Engineering), mentre il frazionamento delle proteine è stato eseguito mediante un apparecchio semiautomatico (Mini Phor 08, Seleco Engineering).

6.4.2 Determinazione delle dimetilarginine SDMA e ADMA

La seconda quota di siero è stato utilizzato per il dosaggio delle dimetilarginine SDMA e ADMA tramite il metodo di cromatografia liquida-spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS), presso il Laboratorio Veterinario San Marco di Padova.

I campioni di siero sono stati conservati a -80°C e spediti al laboratorio in ghiaccio secco; una volta scongelati sono stati estratti 50 microlitri di siero, successivamente sottoposti ad una precipitazione proteica con acetonitrile freddo e addizionato di acido formico. Il campione così ottenuto, dopo opportuna agitazione, è stato sottoposto a centrifuga (64000 g/m); una parte del surnatante è stato trasferito in una provetta e diluito con soluzione di acqua ed acetonitrile addizionato di acido formico, sottoponendolo ad una nuova centrifugazione. Infine l'estratto così ottenuto è stato trasferito in vials per essere successivamente posto nell'autocampionatore dell'apparecchio Uplc/XEVO/TQD. Il metodo di estrazione sierico e la preparazione della curva di calibrazione sono stati eseguiti in maniera

automatica per ridurre al minimo gli eventuali errori operatore dipendente ed ottenere, quindi, una maggiore precisione. In particolare, la curva di calibrazione è stata allestita con soluzioni standard a sei diverse concentrazioni (da 0.1 ng/ml a 100ng/ml) attraverso il preparatore automatico Microstarlab Hamilton. La metodica utilizzata è caratterizzata da una percentuale di recupero (*Recovery*) dell'80 %, da un *Limit of Detection* (LOD) del 0,1 ng/ml e da un *Limit of Quantification* (LOQ) di 0.1 ng/ml. Lo studio dell'effetto matrice del metodo, sviluppato in fase di validazione, è stato effettuato mediante l'esecuzione di tre aggiunte, effettuate in doppio, di ADMA e SDMA standard ad estratti purificati su un livello di concentrazione pari a 10 ng/ml. I range di SDMA e ADMA, stabiliti dal suddetto laboratorio, sono rispettivamente di 0,1-179,8 ng/ml e 0,40-1,89 µg/ml (comunicazione personale).

6.4.3 Esame delle urine

In entrambi i gruppi è stato eseguito un esame chimico-fisico completo delle urine, su campioni di almeno 5 ml raccolti per minzione spontanea; il peso specifico dei campioni urinari è stato valutato tramite metodo refrattometrico e l'esame chimico è stato condotto tramite l'utilizzo di strisce reattive (Strisce Combur-Test®, © 2015 Roche Diagnostics). Dopo centrifugazione del campione, il surnatante è stato utilizzato per la determinazione del rapporto PU/CU con l'apparecchio Catalyst DX (IDEXX Laboratories), mentre il sedimento è stato osservato a fresco al microscopio ottico al fine di escludere la presenza di calcoli e/o sedimento attivo.

6.5 Classificazione ACVIM

Sulla base dei rilievi clinici ed ecocardiografici ottenuti, i cani sono stati classificati secondo i criteri proposti dall'ACVIM (Atkins *et al.*, 2009) in: 1) classe B1, ovvero cani asintomatici con soffio mitralico e senza rilievi strumentali di ingrandimento del settore cardiaco sinistro; 2) classe B2, ovvero cani asintomatici con soffio mitralico e con rilievi strumentali di ingrandimento del settore cardiaco sinistro; 3) classe C, ovvero cani sintomatici con soffio mitralico, sintomi clinici di insufficienza cardiaca congestizia e con rilievi strumentali di ingrandimento del settore cardiaco sinistro. Nel protocollo dello studio venivano esclusi i soggetti

appartenenti alla classe D, in quanto animali in uno stadio avanzato della malattia e già sottoposti a terapia cardiovascolare.

6.6 Classificazione IRIS

Tutti i cani sono stati classificati al momento dell'inclusione seguendo i criteri delle linee guida IRIS (aggiornate al 2015) che si basano sui livelli di creatininemia, di PU/CU e di pressione arteriosa sistemica (<http://www.iris-kidney.com>).

6.7 Analisi Statistica

I dati raccolti durante le visite cliniche ed i risultati ottenuti dalle analisi strumentali sono stati inseriti in un foglio di calcolo elettronico (Microsoft® Excel® 2011 per MAC, v. 14.7.1, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) e da lì importati in due programmi dedicati per l'analisi statistica (JMP® 8.0.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA; Prism 6, GraphPad, Software Inc., La Jolla, CA, USA). Il livello di significatività è stato posto per tutti i test utilizzati a $P < 0,05$. I dati sono stati riportati come media \pm errore standard della media (Standard Error of the Mean – SEM) e (range), indipendentemente dalla normalità della distribuzione. La normalità dei dati è stata testata mediante test W di Shapiro-Wilk. Le differenze tra le classi ACVIM a T_0 sia per SDMA sia per ADMA sono state valutate con test non parametrico di Kruskal-Wallis, a causa della scarsa numerosità dei sottogruppi. *Post hoc*, il test di Dunn veniva applicato per identificare tra quali time points fosse effettivamente presente l'eventuale differenza individuata. L'andamento nel tempo di SDMA e ADMA entro il gruppo P è stato testato con un'Analisi della Varianza per Misure Ripetute (RM-ANOVA) con la correzione di Greenhouse-Geisser o con il test di Friedman, e *post hoc* eventuali differenze tra i singoli time points sono state testate con il test di Holm-Sidak o con il test di Dunn, secondo la distribuzione. Le correlazioni tra SDMA o ADMA e EDV-I, rapporto As/Ao, BUN, Creatininemia e PU/CU entro il gruppo P sono state esplorate applicando i test di Pearson (r – product moment) o di Spearman (r_s – rank-order correlation), secondo la distribuzione, sia sulla totalità dei dati che entro i diversi time points.

- Atkins C, Bonagura J, Ettinger S, Fox P, Gordon S, Haggstrom J, Hamlin R, Keene (Chair), Luis-Fuentes V, Stepien R. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2009; 6: 1142-50.
- Bonagura JD. M-mode echocardiography – Basic principles. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 1983; 13:299–319.
- Brown S, Atkins C, Bagley R, Carr A, Cowgill L, Davidson M, Egner B *et al.* Guidelines for the Identification, Evaluation, and Management of Systemic Hypertension in Dogs and Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2007; 21:542–558.
- Hansson K, Häggström J, Kvart C, Lord P. Left atrial to aortic root indices using two-dimensional and M-mode echocardiography in Cavalier King Charles spaniels with and without left atrial enlargement. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 2002; 43:568–575.
- International Renal Interest Society guidelines (IRIS) 2015. www.iris-kidney.com.
- Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss, ML. *Textbook of Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6th Ed. Elsevier, St. Louis, MO, USA, 2008; pp. 889–895.
- Kienle RD e Thomas WP. Echocardiography. In: Nyland TG e Mattoon JS. *Veterinary Diagnostic Ultrasound*. W.B. Saunders Company 1995. Pag: 198-252.
- Piantedosi D, Di Loria A, Guccione J, De Rosa A, Fabbri S, Cortese L, Carta S e Ciaramella P. Serum biochemistry profile, inflammatory cytokines, adipokines and cardiovascular findings in obese dogs. *The Veterinary Journal* 216 (2016) 72–78.
- Porciello F e Ciaramella P. Principi di elettrofisiologia cardiaca. In: Ciaramella P. *Semeiologia clinica veterinaria*. Poletto Editore 2014; pag: 44-47.
- Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: Results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 1978; 58:1072–1083.
- Shober KE e Fuentes VL. Effects of age, body weight, and heart rate on transmitral and pulmonary venous flow in clinically normal dogs. *American Journal of Veterinary Research* 2001; 62:1447–1454.
- Thomas WP. Two-dimensional real-time echocardiography in the dog. *Veterinary Radiology* 1984; 25:50–64.

Tilley LP. Essentials of canine and feline electrocardiography. 2th edition
Lea and Febiger 1985.

Capitolo 7

Risultati

7.1 Risultati

Il GP comprendeva 5 femmine sterilizzate e 7 maschi interi, di cui 2 Cavalier King Charles Spaniels, 3 meticci, 2 Whippet, ed un solo soggetto appartenente a razze diverse (Barboncino, Bassotto Tedesco a pelo corto, Labrador Retriever, Pinscher, Spitz di Pomerania). Al momento dell'arruolamento, l'età media dei soggetti del GP era di 8 ± 2 (min 5 – max 12) anni, mentre il peso era di $13,9 \pm 7,7$ (min 5,3 – max 26,0) kg e non mostrava nessuna variazione significativa nel tempo.

Il GC era costituito da 6 femmine sterilizzate e 4 maschi interi, rappresentati da soli cani meticci; l'età media era di 7 ± 1 (min 4 – max 8) anni ed il peso di $12,1 \pm 6,9$ (min 2,1 – max 29).

Per quanto riguarda la classificazione ACVIM nell'ambito del GP, a T_0 5 soggetti erano in classe B1, 4 in classe B2 e 3 in classe C. Nessun soggetto mostrava un passaggio di classe funzionale nell'ambito dei diversi controlli. Nel GP 4 cani (n. 3 classe B1 e n. 1 classe B2) non hanno ricevuto terapia con farmaci cardiovascolari; invece, 8 soggetti venivano sottoposti a trattamento terapeutico con ACE-inibitore e/o diuretici (furosemide e spironolattone) (n. 2 classe B1, n. 3 classe B2 e n. 3 classe C), mostrando, nel tempo, un miglioramento della sintomatologia cardio-respiratoria. Per quanto riguarda la classificazione IRIS un solo soggetto passava allo stadio IRIS 2 a T_1 e T_2 ; 3 cani presentavano valori borderline di PU/CU a T_1 e T_2 , in assenza di altre modificazioni della funzionalità renale, mentre 2 soggetti divenivano proteinurici a T_1 e T_2 , pur non mostrando un passaggio di classe IRIS. La **tab. 7.1** riassume l'andamento nel tempo, nel gruppo GP, dei tre parametri di funzionalità renale considerati dalla stadiazione IRIS.

Tab. 7.1 Andamento nel tempo dei parametri di funzionalità renale relativi alla stadiazione IRIS nel gruppo dei cani cardiopatici, espressi come media e ds.

Variabile	T0 (Media \pm Ds)	T1 (Media \pm Ds)	T2 (Media \pm Ds)
Creatinina	$0,90 \pm 0,2$	$0,86 \pm 0,3$	$0,96 \pm 0,2$
PU/CU	$0,17 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,2$	$0,43 \pm 0,4$
PAS	$158 \pm 21,8$	$146 \pm 24,5$	$151 \pm 28,7$

Infine, i dati sulle informazioni nutrizionali ottenuti in entrambi i gruppi GP e GC, rivelavano un'alimentazione molto varia basata sulla somministrazione sia di diete casalinghe che di diete commerciali di diversa tipologia.

7.2 Dimetilargine SDMA e ADMA

Considerando i soggetti appartenenti al GC, i valori medi della concentrazione sierica di SDMA, espressi in ng/ml, e di ADMA, espressi in $\mu\text{g/ml}$, erano rispettivamente di $223,69 \pm 113,53$ e di $1,11 \pm 1,10$. In particolare, i valori di SDMA superavano di poco il limite superiore del range di riferimento utilizzato per la specie canina, fornito dal laboratorio di riferimento (179 ng/ml). Va inoltre evidenziato che è stata rilevata una discreta variabilità delle due dimetilarginine studiate sia nel gruppo controllo che nel gruppo patologico, non mostrando alcuna differenza significativa per entrambi i fattori studiati al momento dell'arruolamento.

Per quanto riguarda l'andamento nel tempo dei livelli ematici dei due isomeri, nella popolazione complessiva del GP la SDMA non mostrava oscillazioni significative ($P=0,58$; **Fig. 7.1**), mentre l'ADMA si modificava sensibilmente (**Fig. 7.2**). In particolare i livelli di quest'ultima si riducevano significativamente tra T_0 , T_1 ($P<0,01$) e T_2 ($P<0,05$) (**Tab. 7.2**).

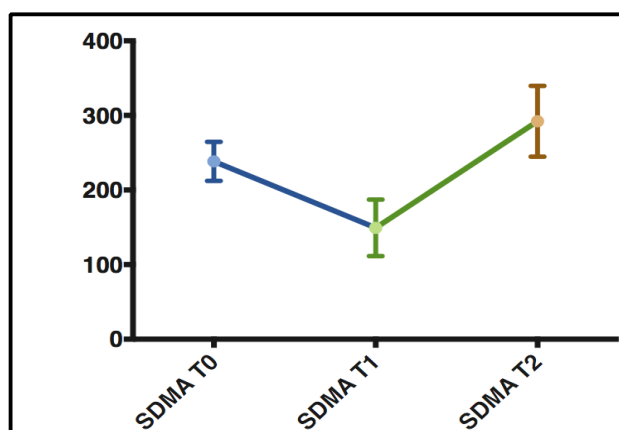


Fig. 7.1 .Rappresentazione grafica dell'andamento nel tempo di SDMA ($P=0,58$).

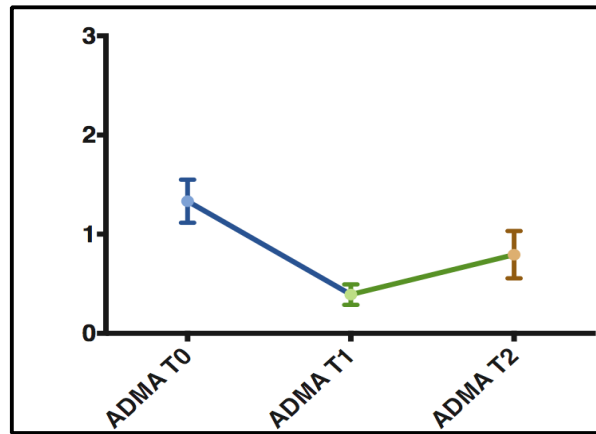


Fig. 7.2. Rappresentazione grafica dell'andamento nel tempo di ADMA (T_0 vs T_1 ; $P=0,01$; T_0 vs T_2 ; $P=0,05$).

Tab.7.2 : Livelli di SDMA (ng/ml) e ADMA (µg/ml) nei cani cardiopatici ai differenti tempi analizzati; le colonne contrassegnate con le lettere A e B differiscono per $P<0,01$; le colonne contrassegnate con le lettere a e b differiscono per $P<0,05$.

Variabile	T_0	T_1	T_2
SDMA (ng/ml)	238,4 ± 26,0	149,3 ± 37,9	292,2 ± 47,4
ADMA (µg/ml)	1,3 ± 0,2 ^{bB}	0,4 ± 0,1 ^a	0,8 ± 0,2 ^A

In relazione alla classificazione ACVIM, il confronto statistico ha permesso di non osservare differenze significative nei livelli di SDMA ($P=0,23$) e ADMA ($P=0,34$) a T_0 (**Fig. 7.3-7.4**).

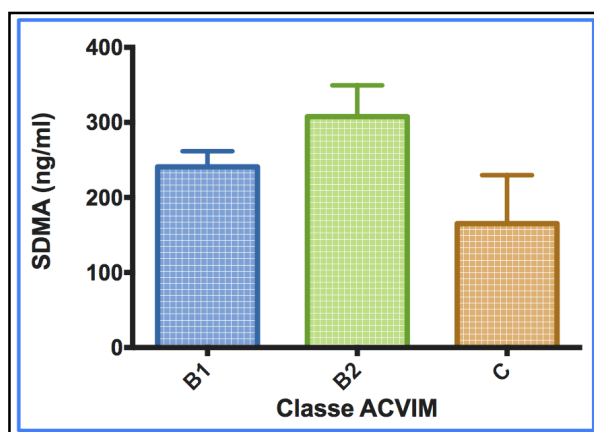


Fig.7.3. Rappresentazione grafica dei livelli di SDMA (ng/ml) nelle classi ACVIM a T_0 ($P=0,23$).

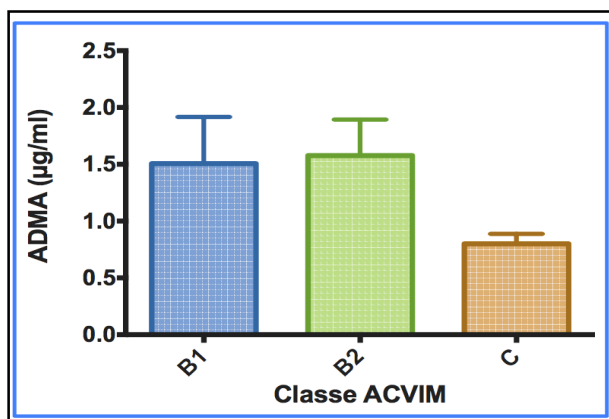


Fig.7.4. Rappresentazione grafica dei livelli di ADMA (µg/ml) nelle classi ACVIM a T_0 ($P=0,34$).

Per quanto riguarda l'analisi di regressione eseguita sul totale dei dati nel GP, SDMA e ADMA erano correlate positivamente a T_0 ($r_s=0,46$; $P=0,01^*$; Fig. 7.5).

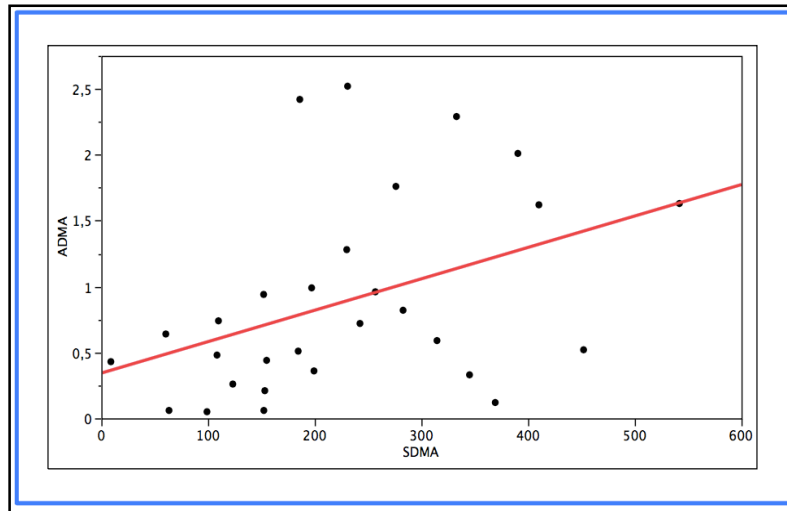


Fig. 7.5. Rappresentazione grafica della correlazione tra SDMA e ADMA ($r_s=0,46$; $P=0,01$).

Inoltre, a T_0 i valori di SDMA risultavano correlati negativamente con quelli del rapporto PU/CU ($r_s = -0,83$; $P=0,002^*$; **Fig. 7.6**).

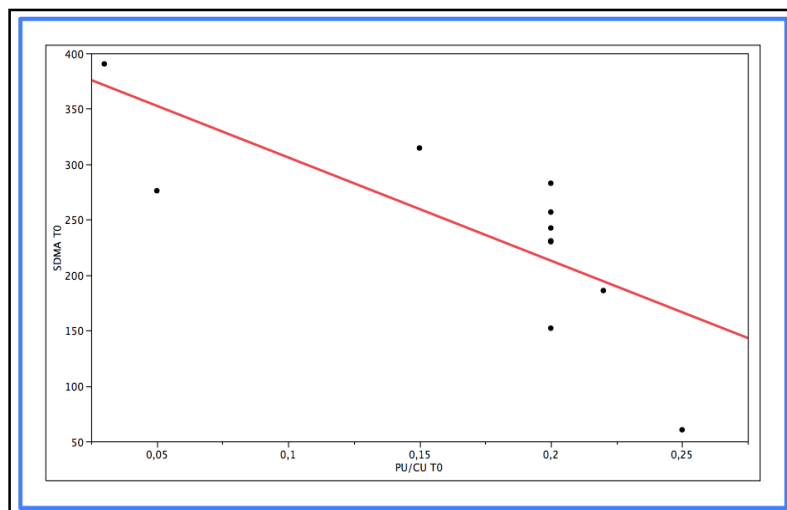


Fig. 7.6. Rappresentazione grafica della correlazione tra SDMA e PU/CU a T_0 ($r_s = -0,83$; $P=0,002$).

A T₁, si rilevava un'analogia correlazione positiva, seppure al limite della significatività, tra SDMA e ADMA ($r_s=0,65$; $P=0,057$). Inoltre, le concentrazioni di ADMA risultavano correlate positivamente a quelle della creatinina ($r=0,74$; $P=0,01$; **Fig. 7.7**).

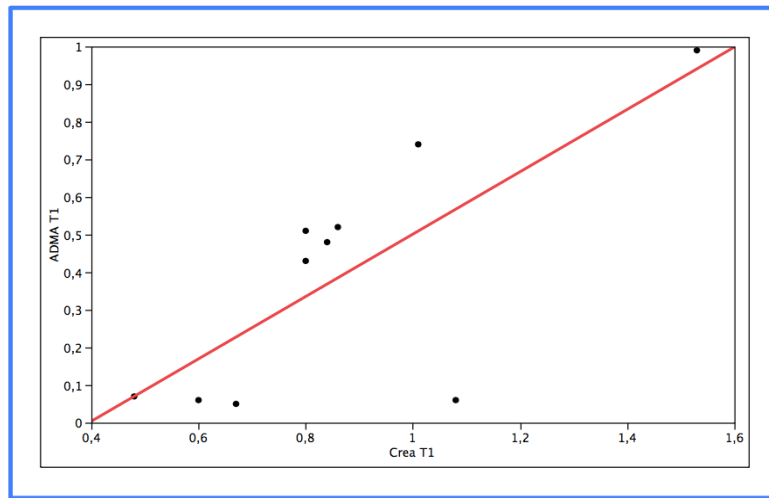


Fig.7.7 Rappresentazione grafica della correlazione tra ADMA e creatininemia a T₁ ($r=0,74$; $P=0,01$).

L'analisi statistica non ha evidenziato nessuna correlazione ai diversi tempi con i valori di BUN e i diversi parametri ecocardiografici sia per l'SDMA che per l'ADMA. Infine, non è stato rilevato alcuna influenza significativa della terapia sull'andamento delle due dimetilarginine.

Capitolo 8

Discussione e conclusioni

8.1 Discussione

Uno dei primi obiettivi del nostro studio è stato quello di approfondire la conoscenza della Dimetilarginina Simmetrica (SDMA), un parametro ematico che in medicina umana non è contemplato tra i biomarker diagnostici di Sindrome Cardiorenale (Ronco e Di Lullo, 2016), a differenza di quanto invece riportato in medicina veterinaria, in cui esso è annoverato tra i potenziali nuovi indicatori di Disordini Cardio-vascolari Renali (CvRD) negli animali da compagnia (Pouchelon *et al.*, 2015). Purtroppo, gli studi sulla Sindrome Cardio-renale nei piccoli animali sono alquanto limitati e si basano soprattutto su parametri tradizionali di insufficienza renale cronica (CKD) (Martinelli *et al.*, 2016). Unitamente alla SDMA, nel nostro studio è stata focalizzata l'attenzione anche sulla sua isoforma asimmetrica (ADMA), per la quale in veterinaria sono disponibili ancora pochi dati (Pedersen *et al.*, 2006; Moesgaard *et al.*, 2005; Moesgaard *et al.*, 2011; Moesgaard *et al.*, 2012; Hall *et al.*, 2014 a). In medicina umana, gli studi sulle due dimetilarginine, SDMA e ADMA, hanno messo in evidenza una certa associazione tra tali biomarker e le patologie renali e/o cardiovascolari. In particolare, è stato evidenziato il ruolo della SDMA come marker endogeno di funzionalità renale, essendo strettamente correlato al tasso di filtrazione glomerulare (GFR). Data l'escrezione prevalentemente renale di tale dimetilarginina, la sua correlazione con il rene risulta più specifica di quella osservata per l'ADMA, nonostante entrambe siano molto simili dal punto di vista biochimico; bisogna comunque sottolineare che un aumento dell'ADMA è stato riportato, sempre nell'uomo, anche in corso di CKD (Kielstein *et al.*, 2006; Schwedhelm e Böger, 2011; Sitar, 2016). Come già accennato, l'ADMA è stata soprattutto definita come un nuovo fattore di rischio cardiovascolare, in quanto è espressione di disfunzione endoteliale (Wilchen *et al.*, 2007; Speranza *et al.*, 2013; Franceschelli *et al.*, 2013); così come è stata descritta una possibile connessione anche tra SDMA e patologie cardiovascolari, data la sua influenza, seppur indiretta, sulla patogenesi del danno endoteliale (Schwedhelm e Böger, 2011). In medicina veterinaria, esistono diversi studi riguardanti l'andamento della SDMA e dell'ADMA in soggetti con malattia renale primaria. Jepson e collaboratori (2008) hanno rilevato, in gatti con CKD ed ipertensione arteriosa sistemica, una correlazione positiva tra le concentrazioni sieriche di SDMA e creatinina, nonché un incremento di entrambe le dimetilarginine. Così come è stata dimostrata una relazione lineare tra la

SDMA e la GFR, sia in gatti sani che affetti da CKD (Braff *et al.*, 2014; Hall *et al.*, 2014 a; Hall *et al.*, 2014 b). Tale associazione tra SDMA e parametri di funzionalità renale è stata dimostrata accuratamente anche nella specie canina (Tatematsu *et al.*, 2007; Nabity *et al.*, 2015; Hall *et al.*, 2016 b).

Per quanto è a conoscenza degli autori, nel cane è presente un'unica indagine sul comportamento della SDMA in corso di malattia cardiaca; Choi e collaboratori (2016) hanno documentato un suo innalzamento, correlato al peggioramento della funzionalità renale, in cani affetti da valvulopatia mitralica a diverso stadio clinico.

Per quanto riguarda l'ADMA, alcuni autori hanno approfondito il suo significato nell'ambito delle patologie cardiache nel cane, rilevando una correlazione meno significativa rispetto a quella osservata nell'uomo e ipotizzando la presenza di altri fattori condizionanti l'andamento di tale dimetilarginina (Pedersen *et al.*, 2006; Moesgaard *et al.*, 2011; Moesgaard *et al.*, 2012). Nell'ambito delle patologie renali, al contrario, è stato riportato un aumento del tasso sierico di ADMA nella sola specie felina (Hall *et al.*, 2014 a).

I dati ottenuti nel nostro studio mostrano una grande variabilità per i valori di SDMA e ADMA, sia nel gruppo controllo che nel gruppo dei soggetti cardiopatici. Nonostante tale variabilità, è stata individuata una correlazione positiva tra le due dimetilarginine al momento dell'arruolamento (T_0) nel gruppo patologici, similmente a quanto riscontrato da Pedersen e collaboratori (2006). Questo dato non sorprende in quanto si tratta di due isomeri derivanti dalla metilazione dello stesso residuo aminoacidico della L-arginina (Pedersen *et al.*, 2006; Schwedhelm e Böger, 2011; Feliers *et al.*, 2015).

La variabilità rilevata nei valori di SDMA potrebbe essere causata dall'influenza della dieta sulla concentrazione di tale dimetilarginina. Diversi studi, infatti, hanno evidenziato che i livelli di SDMA non sono influenzati da fattori quali razza, sesso, età, ritmo circadiano e stress (Moesgaard *et al.*, 2005; Pedersen *et al.*, 2006; Moesgaard *et al.*, 2007), mentre sembrano condizionati dal tipo di alimentazione. Recentemente è stata evidenziata una riduzione dei livelli di SDMA e della creatinina in cani in età geriatrica, utilizzando una dieta bilanciata arricchita di sostanze funzionali bioattive, rappresentate da acidi grassi $\omega 3$ e $\omega 6$, acido lipoico, frutta, vegetali e proteine di alta qualità (Hall *et al.*, 2015 b; Hall *et al.*, 2016 a). Similmente, in medicina umana, è stato descritto che il declino della funzione renale è collegato allo stress ossidativo e/o

all'infiammazione presenti in corso di CKD; tali alterazioni possono essere, però, significativamente ridotte attraverso un'alimentazione integrata con sostanze antiossidanti (Vlassara *et al.*, 2009). Considerando l'eterogeneità delle diete assunte dai cani arruolati nel nostro studio, non possiamo escludere che il fattore alimentare possa aver significativamente influenzato le concentrazioni sieriche di SDMA.

Come già accennato, in medicina veterinaria è ormai noto che la SDMA si correla positivamente con la creatinina e negativamente con la GFR (Jepson *et al.*, 2008; Hall *et al.*, 2014 a, b; Nabity *et al.*, 2015). E' nota anche la correlazione presente tra questi ultimi parametri di funzionalità renale e lo stadio di malattia mitralica cronica; infatti, in uno studio di Nicolle e collaboratori (2007) è stato evidenziato come nelle fasi avanzate della malattia mitralica si osservi un aumento dei valori ematici di azoto ureico e della creatinina, associati ad una riduzione della GFR. Più recentemente, Martinelli e collaboratori (2016) hanno affermato che la malattia mitralica cronica, nel cane, è associata all'aumento della prevalenza di CKD, riscontrando una correlazione positiva tra le classi ACVIM e quelle IRIS, a conferma della interdipendenza esistente tra gli apparati cardiovascolare e renale. Da ciò ne consegue che anche la SDMA potrebbe costituire un indicatore di danno renale in fasi avanzate di CVD.

I nostri risultati non hanno evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa nelle concentrazioni ematiche di SDMA sia tra i due gruppi al momento dell'arruolamento (T_0) sia nel tempo. Tale andamento può essere dovuto al fatto che nel nostro studio sono stati arruolati principalmente animali in fase iniziale di malattia mitralica (prevalentemente in classi ACVIM B1 e B2) in cui, verosimilmente, non si verifica ancora alcuna alterazione renale che, inoltre, non è stata rilevata neppure durante l'intero periodo osservazionale. I nostri dati sono simili a quelli riportati da Pedersen e collaboratori (2006) che non hanno riscontrato nessuna differenza, per entrambe le dimetilarginine, sia tra Cavalier King Charles Spaniels (CKCS) a diverso stadio clinico di rigurgito mitralico sia soggetti malati ed il gruppo controllo.

Per quanto riguarda la stadiazione ACVIM, nel nostro studio, non è stata osservata alcuna variazione significativa per SDMA tra le diverse classi, a T_0 e nei successivi controlli. Questi dati sono analoghi a quelli ottenuti da Moesgaard e collaboratori (2012) in un gruppo di cani CKCS con malattia mitralica cronica a diverso stadio clinico. Tali rilievi possono essere anch'essi spiegati con l'arruolamento nel nostro studio di animali appartenenti prevalentemente alle classi B1 e B2, nelle quali non si

osservavano sensibili modificazioni emodinamiche come dimostrato dalle indagini strumentali eseguite nel tempo.

Va comunque sottolineato che tale risultato si discosta da quanto riportato da Choi e collaboratori (2016), che riferiscono di una differenza significativa nelle concentrazioni sieriche della SDMA tra il gruppo degli animali malati ed il gruppo dei soggetti sani, riscontrando quindi un aumento di tale marker anche in cani con malattia mitralica in fase iniziale. Questi autori, infatti, suggeriscono che in tali soggetti possa verificarsi una riduzione precoce della funzionalità renale, in presenza di valori di creatinina normali. Bisogna comunque evidenziare che questi ultimi dati appaiono difficilmente confrontabili con i nostri a causa del diverso sistema di classificazione dell'insufficienza cardiaca adottato (ISACHC) e alla diversa metodica di determinazione della SDMA (immunoenzimatica). Un ulteriore dato, rilevato nel nostro studio, è rappresentato da una correlazione negativa, a T_0 , tra i valori di SDMA ed il rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria (PU/CU); con molta probabilità, ciò è legato alla variabilità dei valori di tale dimetilarginina riscontrata nel nostro studio. Infatti, tale correlazione non è stata confermata nei successivi controlli (T_1 e T_2); ciò concorda, in parte, con quanto descritto da Hall e collaboratori (2016 a) e Pardo-Marín e collaboratori (2017) che non hanno riscontrato alcuna correlazione significativa tra i due parametri in cani affetti da CKD di differente eziologia. Sulla base di quanto esposto, potrebbe essere condivisibile l'ipotesi avanzata da quest'ultimi autori, secondo i quali la SDMA non costituisce un buon indicatore prognostico per l'andamento della proteinuria nella specie canina (Pardo-Marín *et al.*, 2017).

Per quanto riguarda l'ADMA, nell'uomo è stato descritto che un aumento delle concentrazioni sieriche di tale biomarker è direttamente correlato ad un peggioramento emodinamico della patologia cardiaca (Hsu *et al.*, 2012). I dati presenti in medicina veterinaria, invece, sono ancora molto limitati. Moesgaard e collaboratori (2012) hanno verificato come l'ADMA, a differenza di quanto riportato in umana, non rappresenti un marker ottimale di disfunzione endoteliale in cani CKCS affetti da malattia mitralica cronica a diverso stadio clinico, essendo i valori molto variabili all'interno delle classi di CHF e non associati ai parametri ultrasonografici di funzione endoteliale.

E' importante ribadire che, sempre in medicina umana, sono stati descritti diversi fattori influenzanti le concentrazioni di tale biomarker. In particolare, tutte le condizioni associate ad un incremento dello stress

ossidativo (ipercolesterolemia, ipertensione, patologie coronariche, liberazione di citochine infiammatorie, iperomocisteinemia, iperglicemia, malattie infettive, etc.) compromettono l'attività enzimatica delle DDAH, attraverso una modificazione della cisteina presente nel sito attivo dell'enzima e con conseguente incremento dei livelli circolanti di ADMA (Vallance e Leiper, 2004; Cooke, 2004; Xin *et al.*, 2007; Trocha *et al.*, 2010). A conferma di ciò, diverse ricerche in campo umano hanno descritto che tutte le sostanze aventi azioni antiossidanti possono ridurre le concentrazioni di ADMA e migliorare la funzione endoteliale. Ad esempio, alcuni studi riferiscono una diminuzione di tale parametro in seguito alla somministrazione di ACE-inibitori (nell'ambito di una terapia anti-ipertensiva), grazie al loro potenziale effetto anti-ossidante che si attua attraverso la rimozione di radicali liberi (Trocha *et al.*, 2010; Quintana-Villamandos e Delgado-Baeza, 2016). Tuttavia, in medicina umana, i dati appaiono contrastanti; infatti altri autori descrivono un aumento dei valori sierici dell'ADMA, a seguito del trattamento con ACE-inibitori (in associazione ad altri farmaci cardiovascolari), nonostante il meccanismo non sia stato ancora del tutto chiarito (Speranza *et al.*, 2013; Gamboa *et al.*, 2015). In veterinaria, Moesgaard *et al.* (2005) hanno riportato che l'ADMA non risulta influenzata dalla somministrazione di enalapril e quinapril, in cani asintomatici con rigurgito mitralico, sebbene tale rilievo riguardasse soggetti sottoposti ad una terapia di breve durata (7 giorni).

Nel nostro studio, i valori di ADMA riscontrati negli animali cardiopatici mostravano una significativa riduzione nel tempo, sebbene non statisticamente correlata alla terapia utilizzata e non associata alla presenza di modificazioni della classe ACVIM nel tempo.

Per quanto nella nostra sperimentazione non sia stato approfondito l'aspetto dello stress ossidativo nella patologia mitralica, non possiamo escludere, sulla base di quanto prima esposto, che la terapia somministrata ai nostri pazienti cardiopatici possa aver avuto una certa influenza sull'andamento dell'ADMA. In particolare, l'impiego di ACE-inibitori potrebbe aver determinato una modificazione del grado di disfunzione endoteliale e, di conseguenza, delle concentrazioni sieriche di ADMA, anche se non sufficientemente sensibile da determinare un passaggio di classe funzionale ACVIM.

Un ulteriore risultato del nostro studio, come già accennato, è rappresentato da una discreta variabilità dei valori di ADMA rilevata in entrambi i gruppi esaminati. Attualmente, non sono disponibili dati riguardanti l'influenza dell'alimentazione su tale dimetilarginina nel cane;

tuttavia è ipotizzabile che, data l'analogia biochimico-strutturale dei due isomeri, anche l'andamento dell'isoforma asimmetrica possa essere condizionato dalla dieta somministrata.

Infine, nel nostro studio è stata evidenziata una correlazione positiva tra ADMA e creatinina a T₁, analogamente a quanto riportato da Moesgaard e collaboratori (2011), i quali hanno riscontrato una stretta correlazione tra l'ADMA e le concentrazioni sieriche di creatinina in cani CKCS con patologia mitralica. In medicina umana, la relazione tra funzionalità renale e ADMA è ben conosciuta, essendo quest'ultima metabolizzata prevalentemente (70%) a livello tubulare dagli enzimi DDAH-1 (Schwedhelm e Böger, 2011; Franceschelli *et al.*, 2013).

8.2 Conclusioni

I risultati della presente tesi lasciano ipotizzare che i livelli ematici di SDMA non si modifichino sensibilmente nelle fasi iniziali di malattia mitralica cronica, nelle quali non si osservano modificazioni emodinamiche significative e, verosimilmente, una riduzione della GFR. Così come, è verosimile che l'ADMA non si modifichi a causa di fattori emodinamici, ma sia influenzato da altri fattori (alimentazione, terapie specifiche, etc.) che interferiscono con la condizione di stress ossidativo nel paziente cardiopatico.

Nella specie canina sono auspicabili ulteriori studi su un numero maggiore di soggetti anche in uno stadio clinico più avanzato di patologia mitralica e sottoposti ad un periodo più lungo di terapia, in modo da verificarne meglio gli effetti a lungo termine. Con queste premesse, si potrebbe approfondire sia il reale rapporto di interconnessione tra la cronicità della malattia mitralica e le ripercussioni sul sistema renale, che chiarire l'eventuale ruolo delle dimetilarginine come marker di Sindrome Cardio-renale nel cane.

- Braff J, Obare E, Yerramilli M, *et al.* Relationship between serum symmetric dimethylarginine concentration and glomerular filtration rate in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2014; 8:1699–701.
- Choi BS, Moon HS, Seo SH e Hyun C. Evaluation of serum cystatin-C and symmetric dimethylarginine concentrations in dogs with heart failure from chronic mitral valvular insufficiency. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2016; 79(1):41-46.
- Cooke JP. Asymmetrical Dimethylarginine The Über Marker?. *Circulation* 2004; 109:1813-1819.
- Feliers D, Lee DY, Gorin Y, Kasinath BS. Symmetric dimethylarginine alters endothelial nitric oxide activity in glomerular endothelial cells. *Cellular Signalling* 2015; 27: 1–5.
- Franceschelli S, Ferrone A, Pesce M, Riccioni G and Speranza L. Biological Functional Relevance of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Cardiovascular Disease. *International Journal of Molecular Science* 2013; 14: 24412-24421.
- Gamboa JL, Pretorius M, Sprinkel KC, Brown NJ e Ikizler TA. Angiotensin converting enzyme inhibition increases ADMA concentration in patients on maintenance hemodialysis – a randomized cross-over study. *BMC Nephrology* 2015; 16:167.
- Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M and Jewell DE. Comparison of Serum Concentrations of Symmetric Dimethylarginine and Creatinine as Kidney Function Biomarkers in Cats with Chronic Kidney Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2014 a; 28:1676–1683.
- Hall JA, Yerramilli M, Obare E, *et al.* Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in healthy geriatric cats fed reduced protein foods enriched with fish oil, L-carnitine, and medium-chain triglycerides. *The Veterinary Journal* 2014 b; 202:588–96.
- Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Panickar KS, Bobe G, Jewell DE. Nutritional Interventions that Slow the Age-Associated Decline in Renal Function in a Canine Geriatric Model for Elderly Humans. *The Journal of Nutrition Health and Aging* 2015 b; 20(10):1010-1023.
- Hall JA, MacLea Y J, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Schiefelbein H, Paetau-Robinson I, Jewell DE. Positive Impact of Nutritional Interventions on Serum Symmetric Dimethylarginine and Creatinine

- Concentrations in Client-Owned Geriatric Dogs. PLoS One 2016 a; 18;11(4): e0153653.
- Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Almes K, Jewell DE. Serum Concentrations of Symmetric Dimethylarginine and Creatinine in Dogs with Naturally Occurring Chronic Kidney Disease. Journal of Veterinary Internal Medicine 2016 b; 30:794–802.
- Hsu CP, Lin SJ, Chung MY e Lu TM. Asymmetric dimethylarginine predicts clinical outcomes in ischemic chronic heart failure. Atherosclerosis 225, 2012; 504-510.
- Jepson RE, Syme HM, Vallance C, *et al.* Plasma asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, l-arginine and nitrite/nitrate concentrations in cats with chronic kidney disease and hypertension. Journal of Veterinary Internal Medicine 2008; 22:317–24.
- Kielstein JT, Salpeter SR, Bode-Böger SM, Cooke JP and Fliser D. Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function – a meta analysis. Nephrology Dialysis Transplantation 2006; 21:2445–51.
- Martinelli E, Locatelli C *et al.* Preliminary Investigation of Cardiovascular–Renal Disorders in Dogs with Chronic Mitral Valve Disease. Journal of Veterinary Internal Medicine 2016; 30:1612–1618.
- Moesgaard SG, Pedersen LG, Teerlink T, Haggstrom J e Pedersen HD. Neurohormonal and Circulatory Effects of Short-Term Treatment with Enalapril and Quinapril in Dogs with Asymptomatic Mitral Regurgitation. Journal of Veterinary Internal Medicine 2005; 19:712–719.
- Moesgaard SG, Holte AV, Mogensen T, *et al.* Effects of breed, gender, exercise and white-coat effect on markers of endothelial function in dogs. Research in Veterinary Science 2007; 82:409–15.
- Moesgaard SG, Falk T, Teerlink T, Guðmundsdóttir HH, Sigurðardóttir S, Rasmussen CE e Olsen LH. Brain-natriuretic peptide and cyclic guanosine monophosphate as biomarkers of myxomatous mitral valve disease in dogs. The Veterinary Journal 189 2011; 349–352.
- Moesgaard SG, Klostergaard C, Zois NE *et al.* Flow-Mediated Vasodilation Measurements in Cavalier King Charles Spaniels with Increasing Severity of Myxomatous Mitral Valve Disease. Journal of Veterinary Internal Medicine 2012; 26:61–68.
- Nabity MB, Lees GE, Boggess MM, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Rakitin A, Aguiar J and Relford R. Symmetric Dimethylarginine Assay Validation, Stability, and Evaluation as a Marker for the Early

- Detection of Chronic Kidney Disease in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2015; 29(4):1036-44.
- Nicolle AP, Chetboul V, Allerheiligen T, et al. Azotemia and glomerular filtration rate in dogs with chronic valvular disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2007; 21:943-949.
- Pardo-Marín L, Martínez-Subiela S, [...], e Cerón JJ. Evaluation of various biomarkers for kidney monitoring during canine leishmaniosis treatment. *BMC Veterinary Research* 2017; 23;13(1):31.
- Pedersen LG, Tarnow I, Olsen LH, Teerlink T, Pedersen HD. Body size, but neither age nor asymptomatic mitral regurgitation, influences plasma concentrations of dimethylarginines in dogs. *Research in Veterinary Science* 2006; 80: 336–342.
- Pouchelon JL, Atkins CE, Bussadori C, Oyama MA *et al.* Cardiovascular–renal axis disorders in the domestic dog and cat: a veterinary consensus statement. *Journal of Small Animal Practice* 2015; 56, 537–552.
- Quintana-Villamandos B e Delgado-Baeza E. Does the ADMA/DDAH/NO pathway modulate early regression of left ventricular hypertrophy with esmolol? *Medical Hypotheses* 87 (2016); 44–47.
- Ronco C e Di Lullo L. Cardiorenal Syndrome in Western Countries: Epidemiology, Diagnosis and Management Approaches. *Kidney Dis* 2016; 2:151–163
- Schwedhelm E e Böger RH. The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease. *Nature Reviews Nephrology* 2011; 7:275–85.
- Sitar ME. Asymmetric Dimethylarginine and Its Relation As a Biomarker in Nephrologic Diseases *Biomark Insights* 2016; 11: 131–137.
- Speranza L, Pesce M, Franceschelli S, Bucciarelli T *et al.* The biological evaluation of ADMA/SDMA and eNOS in patients with ACHF. *Front Biosci (Elite Ed)*.2013; 1; 5:551-7.
- Tatematsu S, Wakino S, Kanda T, *et al.* Role of nitric oxide-producing and -de- grading pathways in coronary endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 2007; 18:741–9.
- Trocha M, Szuba A, Merwid-Lad A e Sozański T. Effect of selected drugs on plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels. *Pharmazie* 2010; 65(8):562-71.
- Vallance P e Leiper J. Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine: Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase

- Pathway. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2004; 24:1023-1030.
- Vlassara H, Torreggiani M, Post JB, Zheng F, Uribarri J e Striker GE. Role of oxidants/inflammation in declining renal function in chronic kidney disease and normal aging. *Kidney International* 2009; 76 (114): S3–S11.
- Wilchen DEL, Sim AS, Wang J, Wang XL. Asymmetric dimethyl arginine (ADMA) in vascular, renal and hepatic disease and the regulatory role of L-arginine on its metabolism. *Molecular and Genetics Metabolism* 2007; 91 :309-317.
- Xin HY, Jiang DJ, Jia SJ, Song K, Wang GP, Li YJ, Chen FP. Regulation by DDAH/ADMA pathway of lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in endothelial cells. *Thrombosis and Haemostasis* 2007; 97: 830-838.